

**VERGLEICHENDE IMMUNCHEMISCHE
PROTEINUNTERSUCHUNGEN IN SEREN UND
TRACHEOBRONCHIALSEKRETEN BEI KINDERN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DES IMMUNGLOBULIN A**

Günter Schlimok

1976

Dissertationsdruck

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus der Kinderklinik der Universität München im

Dr. von Haunerschen Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

Vergleichende immunchemische Proteinuntersuchun-
gen in Seren und Tracheobronchialsekreten bei
Kindern unter besonderer Berücksichtigung des
Immunglobulin A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Schlimok

aus
Augsburg

-1976-



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr.med. K.-D. Tympner

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. K. Betke

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 4. 1976

I. Introduction

1. Introduction	1
2. Purpose	2
3. Scope	3
4. Definitions	4
5. References	5
6. Abbreviations	6
7. Symbols	7
8. Units	8
9. Figures	9
10. Tables	10

II. Main Body

1. General	11
2. Specific	12
3. Detailed	13
4. Further	14
5. Additional	15
6. Supplementary	16
7. Concluding	17
8. Summary	18
9. Appendix	19
10. Bibliography	20
11. Index	21
12. Glossary	22

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

III. Appendix

1. Appendix A	23
2. Appendix B	24
3. Appendix C	25
4. Appendix D	26
5. Appendix E	27

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
I. Einleitung	1
1. Geschichte der Erforschung des Immunglobulin A	1
2. Serum-IgA	2
3. Sekretorische Immunglobuline	5
4. Weitere Proteine im Tracheobronchialsekret	11
5. Ziel der vorliegenden Arbeit	11
II. Material	14
1. Serum	14
2. Sekrete	14
III. Methoden	17
1. IgA-Latex-Test	17
2. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	19
3. Einfache radiale Immundiffusion (RID) nach MANCINI	21
4. Geldiffusions-Plattentechnik nach OUCHTERLONY	25
5. Zweidimensional Immunelektrophorese nach LAURELL, modifiziert n. CLARKE u. FREEMAN	27
6. Diskontinuierliche Polyacrylamidgелеlektrophorese	32
IV. Ergebnisse und Diskussion	
1. IgA-Latex-Test	35
A. Ergebnisse	35
B. Diskussion	38

2. Selektive quantitative Bestimmung des Sekret-11s-IgA	40
A. Ergebnisse	41
B. Diskussion	55
3. Reifung der lokalen Immunabwehr	58
A. Ergebnisse	58
B. Diskussion	69
4. Vergleich der 11s-IgA-Konzentration im Tracheobronchialsekret bei gesun- den und kranken Kindern	72
A. Ergebnisse	75
B. Diskussion	87
5. Immunglobulinbestimmungen im Sputum und Serum nach iv. Injektion eines IgM/IgA-Konzentrates bei einem Patienten mit einer Agammaglobulin- ämie (Typ BRUTON)	94
A. Ergebnisse	95
B. Diskussion	97
6. Bestimmung weiterer Serumproteine im Tracheobronchialsekret	99
A. Ergebnisse	101
B. Diskussion	102
7. Übersichtsdarstellung der Proteine des Tracheobronchialsekrets	105
A. Ergebnisse	105
B. Diskussion	113
V. Zusammenfassung	116
VI. Literaturverzeichnis	118
Lebenslauf	

I. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Proteinen im Serum und Tracheobronchialsekret, sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Zuständen.

Besondere Beachtung findet das Immunglobulin A.

Durch Erprobung von Methoden zur IgA-Bestimmung und deren Anwendung in Seren und Sekreten soll versucht werden, einer Klärung der Bedeutung des IgA für die Immunabwehr im Kindesalter näher zu kommen.

1. Geschichte der Erforschung des Immunglobulin A (30)

Als GRABAR und WILLIAMS 1953 (32) die Immunelektrophorese als zusätzliches biologisch-physikalisches Hilfsmittel zur Differenzierung von Eiweißgemischen einführten, waren durch die Arbeiten von TISELIUS, SVEDBERG und PEDERSEN (89) sowie WALDENSTRÖM (100) das IgG als 7S- und das IgM als 19s-Komponenten des γ -Globulin-Systems im Serum bekannt. Zunächst entging der Aufmerksamkeit der Immunologen eine weitere, kürzere Präzipitationslinie, die sich in der Folge als Linie der dritten Hauptkomponente des γ -Systems erwies. 1957, 4 Jahre nach Einführung der Immunelektrophorese fanden BURTIN und Mitarbeiter (17), daß gewisse Myelomproteine nicht mit der IgG-Linie, sondern mit einer im Normalserum schwachen, kürzeren, im β -Bereich endenden Linie immunelektrophoretisch übereinstimmen. Diese Tatsache führte zur Anerkennung des β_2 A-Globulins als dritter Komponente des γ -Systems. Auf der internationalen Nomenklaturkonferenz 1964 wurde für dieses Immunglobulin die Bezeichnung IgA oder γ A festgelegt. Dem Ehepaar HEREMANS gelang es, in Zusammenarbeit mit Professor SCHULTZE und seinen Mitarbeitern von den BEHRING-WERKEN, noch im Jahre 1957 β_2 A-Globulin aus dem Serum zu isolieren.

Zur gleichen Zeit wurden auch Berichte über papier-elektrophoretische Untersuchungen im Speichel von Normalpersonen und Myelompatienten bekannt (29). Das Immunelektrophoresebild zeigte stets eine gegenüber dem Serum verkürzte γ -Linie, die 1962 als IgA charakterisiert werden konnte. Wenig später entdeckten TOMASI und ZIGELBAUM (91), daß das IgA den Hauptanteil der Immunglobuline des Gesamtspeichels, des Parotisspeichels und anderer Sekrete darstellt. Viel Arbeit wurde in der Folgezeit in der Erforschung des IgA und seiner biologischen Bedeutung geleistet. Analog zum humoralen Immunsystem des Plasmas postulierte man das humorale Immunsystem der Sekrete.

2. Serum - IgA

Eigenschaften des IgA im Vergleich zu IgG und IgM können aus Tabelle 1 entnommen werden.

Serum-IgA-Spiegel bei einigen Krankheitsbildern sind aus Tabelle 2 zu ersehen.

Für das Gebiet der Kinderheilkunde ist von besonderer Wichtigkeit, daß die Immunglobuline IgA und IgM im Gegensatz zu IgG nicht diaplazentar auf den Feten übertragen werden. Der menschliche Fetus ist ab der 20. Schwangerschaftswoche zur Eigenproduktion geringer Mengen von Immunglobulinen fähig (23,27,64,78). Im Nabelvenenblut gesunder Neugeborener finden sich nur Spuren von IgA, die unter physiologischen Bedingungen bis zum 7. Lebenstag auf $2,4 \pm 1,5$ mg/100ml ansteigen (97,98). (Abb. 1)

Unter pathologischen Bedingungen, bei intrauterin erworbenen Bakterien-, Protozoen- oder Virusinfektionen, bildet der menschliche Fetus als Antwort auf den Kontakt mit mikrobiellen Antigenen vermehrt Antikörper der IgM- und auch IgA-Klasse.

	IgG	IgA	IgM
Molekulargewicht	155.000	170.000	950.000
Sedimentationskonstanten	7 S	7 S	19 S
Schwere Ketten	γ 1-4	α 1,2	μ 1,2
% Kohlehydrate	3	8	12
Serumspiegel (mg/100 ml)	800-1800	90-480	60-280
Halbwertszeit (Tage)	24	6	5
Täglicher Umsatz (g/70 kg)	2,3	1,7	0,5
Verteilung: intravaskulär	40%	40%	80%
andere		Sekrete	
Plazentatransfer	+	0	0
Toxinneutralisation	++++	?	+
Bakteriolyse	+	+	++++
Virushemmung	+	+++	+
Reaginsche Aktivität	?	0	0
Komplementfixation	+	-	+

Tabelle 1 Immunglobuline des Menschen (mod. nach Hobbs, 1971) (30)

<u>erhöhte Spiegel</u>
Mucoviscidose, chron. Bronchitiden, Bronchiektasen
Allergie, Asthma bronchiale, Autoimmunkrankheiten
Leberzirrhose, Alkoholleber
neugeborene Kinder mit materno-foetaler Transfusion
<u>niedrige Spiegel</u>
fehlt bei neugeborenen Kindern
Ataxia teleangiectatika
" IgA - deficient - sprue " - syndrome
Dysgammaglobulinaemien Typ
Kinder mit rezid. Infektionen der oberen Luftwege
intestinale Lymphknotenhyperplasie

Tabelle 2 Serum IgA-Spiegel bei einigen Krankheitsbildern (97)

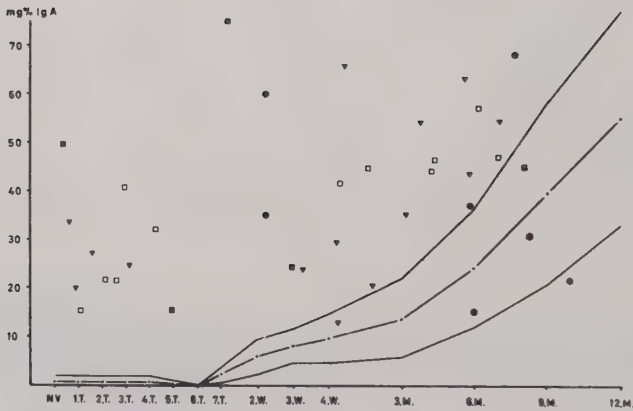


Abb. 1
(97)

IgA-Serumkonzentrationen bei Kindern mit intra-uterin erworbenen Infektionen

■ Toxoplasmose, ● Zytomegalie-Virus-Infektion,
▼ Röteln, □ Lues.

Hintergrund: "Normwerte"

Dabei sind erhöhte IgM- und IgA-Konzentrationen im Nabelvenenblut Hinweise auf intrauterin erworbene Infektionen. Können in den ersten zwei Lebenstagen IgM- Serumkonzentrationen von 30 mg / 100 ml und darüber gefunden werden, so liegt mit großer Wahrscheinlichkeit eine intrauterin erworbene Infektion vor. Gelegentlich vorkommende falsch-positive und falsch-negative Resultate schränken jedoch die Aussagekraft ein.

Bei Neugeborenen mit intrauterin erworbenen Infektionen wie Toxoplasmose, Zytomegalie, Röteln, Herpes und Lues (Abb. 1) sind auch die IgA-Konzentrationen erhöht (51,63,80,97,98). Beim Vorliegen einer erhöhten IgM- und IgA- Konzentration im Nabelschnurblut (13) kann eine pränatale Infektion als weitgehend sicher angenommen werden; es sei denn, ein maternofetaler Blutübertritt fand statt (47). Bei letzterem ist das Verhältnis der IgM- und IgA- Serumkonzentrationen zueinander charakteristisch. Es beträgt etwa 1 : 1 (64), entsprechend der Relation im mütterlichen Serum.

3. Sekretorische Immunglobuline (95)

Obwohl die Existenz einer regional begrenzten, nicht von Serumantikörpern abhängigen Immunität von Geweben bereits früher vermutet worden war, ist das Konzept eines mehr oder weniger eigenständigen sekretorischen Immunsystems vergleichsweise neu (92,93,95).

Es beruht auf der Beobachtung, daß sich der Immunglobulin-gehalt bestimmter nichtvaskulärer Flüssigkeiten stark von dem des Serums unterscheidet (5,9,16,39,46,83,84,91).

Das IgA, das 10 - 15 % der Serum- Immunglobuline ausmacht, herrscht in den meisten Sekreten vor, die die mit der Körperoberfläche in Kontakt stehenden Schleimhäute spülen.

Auf diese Weise konnten die nichtvaskulären Flüssigkeiten je nach dem Verhältnis der einzelnen Immunglobulin-Klassen in zwei große Gruppen aufgeteilt werden.

a) Interne Sekrete

Kammerwasser des Auges, Zerebrospinal-, Synovial-, Amnions-, Pleura-, Peritoneal-, Gingival-Flüssigkeit. Die einzelnen Immunglobuline, mit Ausnahme des IgM, sind hierin in einem Verhältnis enthalten, das dem des Serums ähnelt.

b) Äußere Sekrete

Speichel, Tränenflüssigkeit, Nasal-, Tracheobronchial-, Intestinal-, Gallen-, Zervikal-Sekret und Urin.

In ihnen herrscht das IgA vor. Die meisten äußeren Sekrete enthalten auch andere Immunglobuline, von denen einige, wie das IgM und IgE, auch in größerer Konzentration vorkommen, als es der Transsudation aus dem Serum entspräche.

Es gibt viele Hinweise dafür, daß diese sekretorischen Immunglobuline zum größten Teil lokal in Plasmazellen der Lamina propria der Schleimhaut oder des Gewebes der Speicheldrüsen produziert werden.

Zwischen Serum- und sekretorischem- Antikörper-Gehalt besteht eine unabhängige Regulation, gewöhnlich bewirkt durch lokale Synthese, gelegentlich jedoch auch durch selektiven Transport vom Serum her (6).

Die Antikörper der IgG-, IgE- und zum größten Teil der IgM-Klasse in der Sekretflüssigkeit besitzen physikalisch und chemisch sehr ähnliche oder identische Eigenschaften wie die entsprechenden Immunglobuline im Serum. An einen geringen Teil des Sekret-IgM (ca. 10 %) ist eine sekretorische Komponente (SC) gebunden, die möglicherweise mit der SC am sekretorischen IgA-Molekül identisch ist (90).

Die IgA-Antikörper, die in den verschiedenen äußeren Sekreten gefunden werden, scheinen chemisch ähnlich, wenn nicht sogar völlig gleich aufgebaut zu sein. Sie besitzen einen Sedimentations-Koeffizienten von 11s und ein Molekulargewicht von über 390.000.

In den meisten Sekreten werden auch kleinere Mengen von höheren Polymeren des IgA gefunden, die Dimere und Trimere des sekretorischen IgA-Moleküls darstellen (93).

Außerdem handelt es sich bei etwa 10% des IgA im Sekret um 7s-Serum-IgA. Dieses stammt zum Teil- wie auch der größte Teildes Sekret-IgG- via Transsudation aus dem Serum.

Das sekretorische IgA-Molekül besteht aus zwei 7s-IgA-Monomeren und einem nicht zu den Immunglobulinen gehörenden Glykoprotein (Abb. 2). Diese sogenannte sekretorische Komponente (SC) wurde früher als "secretory piece" bzw. Transport- oder T-Kette bezeichnet (83,96). SC enthält über 6% Kohlenhydrate und hat ein Molekulargewicht von ca. 60.000 (93).

Jedes 7s-Molekül besteht wiederum aus zwei L- oder leichten Polypeptidketten (Molekulargeicht 22.500) und zwei H- oder schweren Ketten (Molekulargewicht 55.000). (Abb. 2)

Im menschlichen S-IgA-Molekül ist SC über Disulfid-Brücken an die speziellen H-Ketten des IgA (α -Ketten) gebunden. Mit Ausnahme der 7s-Moleküle besitzen alle IgA-Moleküle in den verschiedenen externen Sekreten eine sekretorische Komponente (93).

Zusätzlich zu den drei Polypeptidketten (L,H und SC) wurde eine vierte Kette im S-IgA identifiziert, die sogenannte J-Kette (36). Die J-Kette besitzt ein Molekulargewicht von ca. 20.000 und enthält ungefähr 10% Kohlenhydrate. Sie wurde auch im polymeren IgA und IgM des Serums festgestellt, nicht jedoch in IgE, IgG oder IgD. Demnach erscheint die J-Kette charakteristisch für polymere Immunglobuline zu sein. Man nimmt an, daß sie eine unterstützende Funktion ausübt, um die Untereinheiten dieser Moleküle zu verklammern oder zu verbinden.

Fluoreszenz-Antikörperstudien legen die Vermutung nahe, daß die J-Kette in der Lamina propria produziert wird, und zwar in den Plasmazellen, die Immunglobulin synthetisieren (36,45,59,69).

Es ist heute bekannt, daß der größte Teil des S-IgA lokal in jenen Plasmazellen synthetisiert wird, die in enger anatomischer Nachbarschaft zur Mukosamembran bzw. zum glandulären Epithel liegen.

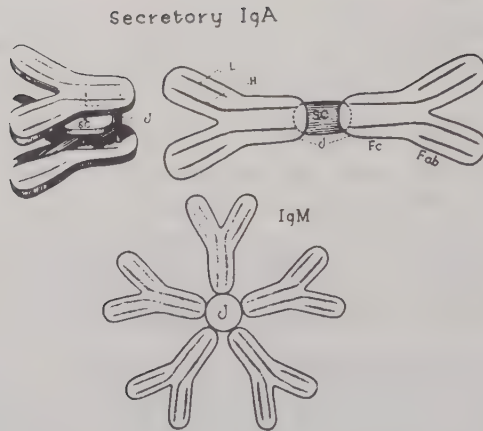


Abb. 2 Schemazeichnung von sekretorischem IgA und IgM. Beide Formen des IgA (links in Kompaktform, rechts ausgefaltet) konnten unter dem Elektronenmikroskop dargestellt werden (95)

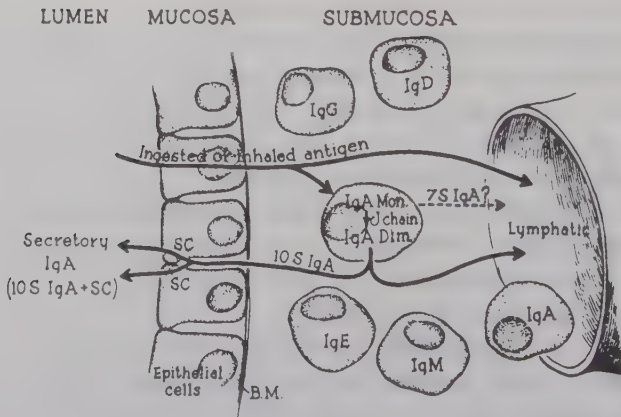


Abb. 3 Ort der Synthese und Transportrichtung von Immunglobulinen im Submukosa-Bereich eines sekretorischen Organs (95)

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Technik wurde festgestellt, daß die IgA-Plasmazellen in der Submukosa signifikant überwiegen. So enthält 1mm^3 Lamina propria ca. 400.000 Plasmazellen. Davon bilden etwa 350.000 IgA, 50.000 IgM und nur 15.000 IgG (96).

Das 11s-IgA-Molekül kann, nachdem es einmal in den Plasmazellen der Lamina propria gebildet ist, in zwei Richtungen diffundieren oder transportiert werden: einmal durch die Mukosa-Membran hindurch in das entsprechende Sekretionslumen oder aber rückwärts in die Lymphgänge und in den Kreislauf. Beobachtungen an mehreren Species legen die Vermutung nahe, daß IgA aus sekretorischem Gewebe in begrenztem Rahmen auch eine Quelle für das Serum-IgA ist.

Beim Durchtritt durch das Epithel wird in den epithelialen Zellen gebildete sekretorische Komponente (SC) eingebaut. SC wird in den Epithelzellen unabhängig von der IgA-Produktion gebildet (96). SC ist somit auch dann nachweisbar, wenn kein IgA vorhanden ist, z.B. beim Neugeborenen oder bei IgA-Mangelsyndromen (83,85). Welche Aufgabe dem SC zukommt, ist noch nicht völlig geklärt. Anfangs wurde vermutet, daß SC den Transport in das Lumen begünstigt; heute wird der Tatsache, daß S-IgA im Vergleich zum Serum-IgA, dem die SC-Komponente fehlt, einen stärkeren Widerstand gegen die Proteolyse aufweist, eine größere Bedeutung zugeordnet (94). SC bewahrt also eventuell das S-IgA auf seinem Weg durch das epitheliale Zytoplasma vor einer intrazellulären Aufspaltung und verschafft dem S-IgA einen gewissen biologischen Vorteil gegenüber den anderen Antikörpern, die in einer derart komplexen Umgebung wie den externen Sekreten tätig sind. Der Weg des Transports aus dem Interstitium in das Lumen geht aus Abb.3 hervor.

Es wurde eindeutig festgestellt, daß das S-IgA eine neutralisierende Wirkung gegenüber Viren besitzt und daß diese Fähigkeit für die Wachstums-Hinderung und die Schutzwirkung verantwortlich ist, wie man es bei verschiedenen Virusinfektionen beobachtet hat (101). Wie die S-IgA-Antikörper ihre schützende Wirkung gegenüber bakteriellen

Infektionen ausüben, ist nicht ganz geklärt, da den IgA-Antikörpern die Fähigkeit zur Komplementbindung fehlt (43,83). Ein Weg zu einem Verständnis der Wirkung gegenüber Bakterien könnte sich aus der Entdeckung ergeben, daß sekretorisches IgA das Anhaften von Bakterien auf den Epithelzellen verhindert (107). Andererseits läßt sich die Protektive Wirkung der IgA-Antikörper auch so erklären, daß durch sie die Phagozytose gefördert wird, wahrscheinlich vor allem mittels Monozyten. Dieser Mechanismus betrifft möglicherweise mehr jene Partikel, die unterhalb der Mukosamembran in den submukösen Bereich eingedrungen sind. Zusätzlich zu ihrer schützenden Wirkung gegenüber Mikroorganismen haben die sekretorischen Immunglobuline, besonders jene des Gastrointestinal-Trakts, eine andere Aufgabe. Sie bilden Antikörper gegenüber nicht-lebenden Antigenen, die hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen werden und verhindern so deren Zugang in den Hauptkreislauf. Ein unreifes sekretorisches System bei Kleinkindern kann so die Ursache für die hohe Incidenz von Anti-Milch-Antikörpern sein.

Am besten läßt sich die wichtige Rolle des 11s-IgA bei Viruserkrankungen feststellen (18,44,70,82).

Bei Viren, wie Myxoviren, Rhinoviren, RS-Viren und Adenoviren, beschränkt sich die Infektion auf die Mukosa. Andere Erreger, wie Polio, ECHO und Masern führen nach der lokalen Replikation zu einem Stadium der Virämie mit folgender Systeminfektion. Für letztere Gruppe spielen die zirkulierenden Antikörper die wichtigere Rolle, während für die erste Gruppe die sekretorischen, lokalen Antikörper entscheidend sind.

Diese Erkenntnisse beeinflussen auch die Entwicklung von Impftechniken. So kann durch eine lokale Immunisation gegen Influenza- oder Rhinovirus eine effektvollere Immunität erzielt werden als durch eine systemische Immunisation (31).

Bei isolierten IgA-Defekten findet man auch ein Fehlen bzw. eine starke Verminderung des sekretorischen IgA. Solche Patienten neigen dementsprechend zu Infekten des Bronchial- und Gastrointestinaltrakts; es wurden aber auch Fälle ohne jegliche Krankheitssymptome beschrieben. In manchen Fällen scheint IgM für das IgA in den Sekreten funktionell einzuspringen (2,8,24,40,50,57,67,102).

4. Weitere Proteine im Tracheobronchialsekret

Neben den drei Immunglobulinen IgA, IgM und IgG werden im Tracheobronchialsekret weitere Serumproteine qualitativ nachgewiesen (53,75):

Albumin, α_1 -Antitrypsin, Haptoglobin, α_2 -Makroglobulin, Haemopexin, Transferrin, β_1 A-Globulin, Coeruloplasmin. Außer den Serumproteinen, die in sehr geringen Mengen in den Sekreten zu finden sind, enthalten diese noch Sekret-spezifische Eiweiße. Von letzteren seien außer dem oben beschriebenen sekretorischen IgA noch das Lactoferrin erwähnt. Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein, das elektrophoretisch in der α_2 -Fraktion wandert und bakterio-statische Fähigkeiten besitzt; sein Molekulargewicht beträgt etwa 90.000.

Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde festgestellt, daß Lactoferrin in den serösen Zellen der Drüsen produziert wird, die entlang der Trachea und der Bronchien zu finden sind.

Dagegen wird von den oberflächlichen Epithelzellen, in denen die Bildung der sekretorischen Komponente des 11s-IgA stattfindet, kein Lactoferrin erzeugt (54,55).

5. Ziel der vorliegenden Arbeit

I. Erprobung eines Schnelltests zur qualitativen oder semiquantitativen Bestimmung von IgA.

Der IgA-Latex-Test wurde auf Wunsch von den Behringwerken

(Marburg) entwickelt und soll als Screeningtest zur Erhärtung der Diagnose einer intrauterin erworbenen Infektion oder zum Nachweis eines lokalen IgA-Mangels an Schleimhäuten in die Routine Eingang finden (74).

II. Untersuchung des Tracheobronchialsekrets (TBS)

Die Untersuchungen werden sowohl an gesunden als auch an kranken Kindern aller Altersstufen durchgeführt.

Bei den Untersuchungen von Bronchialsekret tauchen mehrere Schwierigkeiten auf.

a. Das Material kann in ausreichender Menge praktisch nicht unverdünnt gewonnen werden; vor dem Absaugen muß die Trachea bzw. der entsprechende Bronchus mit physiologischer Kochsalzlösung gespült werden. Dieses nun verdünnte Sekret enthält eine unbekannt, von Probe zu Probe variierende, Menge an Tracheobronchialsekret. Deshalb ist eine Konzentrationsangabe in mg / 100ml TBS nicht möglich. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wird von jeder Probe die Gesamteiweißkonzentration bestimmt und die einzelnen, zu bestimmenden Proteine in mg / 100mg Gesamtprotein ausgedrückt.

b. Unter physiologischen Bedingungen gehören, wie oben ausgeführt, etwa 90% der IgA-Antikörper zur Gruppe der sekretorischen IgA-Antikörper (11s- IgA); bei Entzündungen kommt es zu einer Exsudation von 7s-Serum-IgA ins Sekret.

Mit den herkömmlichen IgA-Bestimmungsmethoden (Verwendung von Antiseren gegen Serum-IgA), wie sie in der Literatur immer wieder zu finden sind, ist eine Unterscheidung zwischen 7s- und 11s- IgA nicht möglich. Auf diese Weise kann ein 11s-IgA-Mangel, d.h. eine verminderte Produktion von SC oder ein Defekt der Kopplung SC + IgA, leicht übersehen werden, der vielleicht ätiologisch und pathogenetisch von Bedeutung ist.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Bestimmung des sekretorischen IgA (11s-IgA).

1. Es wird der Versuch unternommen, selektiv 11s-IgA mit Methoden zu messen, die in jedem Routinelabor durchgeführt werden können.
Als weiteres sekretspezifisches Protein wird Lactoferrin quantitativ bestimmt.
2. An Hand von 11s-IgA-Bestimmungen in verschiedenen Altersgruppen wird die Reifung der lokalen Immunabwehr dargestellt.
3. Die 11s-IgA-Werte im Sekret kranker und gesunder Kinder werden miteinander verglichen. Dabei wird besonders der Frage nachgegangen, inwieweit ein 11s-IgA-Mangel ätiologisch für chronische Atemwegsinfektionen verantwortlich sein kann.
4. Bei einem Patienten mit einem äußerst niedrigen IgA-Serumspiegel (1,7 mg%) werden nach parenteraler Injektion eines IgM/IgA-Konzentrates die Ig-Spiegel im Serum und Sputum gemessen. Es wird geprüft, inwieweit es zu einem Durchtritt von IgA aus dem Serum in die Sekrete kommt.
5. Neben dem IgA werden in den Sekreten und den entsprechend zugehörigen Seren folgende Proteine bestimmt: Albumin, α_1 -Antitrypsin, Coeruloplasmin, α_2 -Macroglobulin, β_1 A-Globulin, IgM, IgG
6. Mit verschiedenen immunchemischen Methoden soll versucht werden, eine Übersichtsdarstellung der Proteine im Tracheobronchialsekret zu erreichen.

II. Material

1. Serum

- a. Zur Erprobung des IgA-Latex-Test wurden insgesamt 160 Seren untersucht, 80 nach Altersgruppen ausgewählte Seren von Kindern und 80 Nabelvenenseren.⁺⁾ Die Auswahl der Seren geschah nach keinen besonderen Gesichtspunkten.
- b. Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Tracheobronchialsekrete wurde zu jedem Sekret das entsprechende Serum untersucht. Insgesamt waren dies 71 Proben.
- c. Serumuntersuchungen erfolgten auch vor und nach parenteraler Injektionen eines IgM/IgA-Konzentrates bei einem Patienten mit einer Agammaglobulinämie (Typ BRUTON). Die Lagerung der Seren von der Gewinnung bis zur Aufarbeitung erfolgte bei -20°C . Sie wurden nicht öfter als zweimal aufgetaut.

2. Sekrete

a. Tracheobronchialsekret

Auswahl der Patienten

Insgesamt untersuchten wir 75 Sekrete von 61 Kindern (Alter: 15 Tage bis 14 Jahre) und 5 Erwachsenen.

62 Sekrete stammen von 53 Kindern, bei denen an der Universitäts-Kinderklinik München im Zeitraum zwischen 15.3.73 und 1.8.74 eine Bronchoskopie⁺⁺⁾ durchgeführt wurde. Zu jeder Bronchoskopie verfassten die Untersucher einen Bericht, der unter anderem Aufschluß über den Zustand der Schleimhaut im Tracheobronchialsystem und deren pathologische Veränderungen gibt.

⁺⁾ Die Nabelvenenseren wurden dankenswerter Weise von Prof. Dr. H. Welsch, II.Universitäts-Frauenklinik München, zur Verfügung gestellt.

⁺⁺⁾ Die Bronchoskopien führten Frau Dr. Ina Butenandt und Herr Dr. Karl Mantel durch.

Aufgrund dieses Berichtes und der klinischen Symptome der Patienten erfolgte eine Unterteilung in mehrere Gruppen.

1. Patienten ohne entzündliche oder degenerative Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut = Normalwerte.
2. Patienten mit entzündlichen oder degenerativen Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut.
 - a. Patienten mit akuten, noch nicht rezidivierenden Entzündungen.
 - b. Patienten mit chronischen entzündlichen oder degenerativen Erkrankungen.

Gewinnung des Tracheobronchialsekretes

Nach Anästhesie wurde der Larynx mit einem Laryngoskop eingestellt. Die weitere Beurteilung des Tracheobronchialsystems geschah durch eine Optik nach Einführung in die Trachea bzw. einen Hauptbronchus.

Die Entnahme des Sekretes erfolgte gezielt aus der Trachea bzw. einem der Hauptbronchien, entsprechend dem Ort der pathologischen Veränderung. Hierzu wurde nach Spülung mit einer nicht konstanten Menge von NaCl das Sekret mit einem Metall oder Plastikkatheder abgesaugt.

Neben diesen 62 Proben arbeiteten wir noch 13 Sekrete von weiteren 8 Kindern und 5 Erwachsenen auf.

Diese Sekrete stammen ausnahmslos von Patienten, die in der Klinik intubiert werden mußten und bei denen in der Anamnese keine Erkrankungen der Atemorgane bekannt waren. Das Sekret wurde mit einem Saugapparat abgesaugt, nachdem zuvor ein steriler Absaugekatheder durch den Tubus etwa bis in die Höhe der Bifurkation geschoben worden war.

b. Sputum

Insgesamt 9 Sputenproben eines 14 Jahre alten Agammaglobulinämie-Patienten, wurden vor und nach Injektion eines IgM/IgA-Präparates gesammelt;

Aufarbeitung der Sekrete

1. Verhinderung bakteriellen Wachstums durch Zugabe von Thiocid 1 : 1.000 sofort nach der Sekretgewinnung.
2. Homogenisierung von Proben mit größeren Schleimpartikeln durch heftiges Schütteln nach Zugabe kleiner Glaskügelchen
3. Zentrifugation für 30 Minuten bei 3500 UPM (46)
4. Ausschluß aller Proben von der weiteren Untersuchung, die Erythrozyten im Sediment oder Haemoglobin im Überstand enthalten.
5. Konzentration der Überstände mit Kollodiumhülsen und Unterdruck (500 mmHg) (SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. UH 100). Der Wirkungsgrad von Kollodiumhülsen beträgt 100% für Cytochrom C mit einem Molekulargewicht von 12.400. Das Filtrat ist im Sinne der Sulfosalicylsäurereaktion eißweißfrei.
6. Lagerung der eingeengten Proben (etwa 0,5 ml) bei -20°C ; die Sekrete wurden nicht öfter als zweimal aufgetaut.

III. Methoden

1. IgA-Latex-Test (74)

Der IgA-Latex-Test beruht auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen dem Antigen (Serum-IgA) und dem Antikörper (Anti-IgA). Das neuartige an dieser, von den BEHRINGWERKEN, Marburg entwickelten Methode besteht im Gegensatz zu anderen Verfahren (79) darin, daß die Latex-Partikel mit Anti-IgA beladen sind. Werden diese Teilchen nun mit einem antigenhaltigen Serum zusammengebracht, so erfolgt eine Agglutination der immunologisch inerten Latex-Partikel als Ausdruck der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dadurch ist der Nachweis erbracht, daß IgA in der Serumprobe vorhanden ist (Einphasenreaktion).

In der Zweiphasenreaktion wird in einem ersten Testschritt das Probandenserum mit einer Anti-IgA- enthaltenden (Puffer) Lösung versetzt. Diese enthält genau soviel Anti-IgA, daß im Serum 2 mg/100 ml abgebunden werden. Im 2. Testschritt werden die Anti-IgA-tragenden Latex-Partikeln zugesetzt. Seren, die weniger als 2 mg/100 ml IgA enthalten, reagieren jetzt negativ, da schon ihr gesamtes IgA abgebunden ist, während solche mit mehr als 2 mg/100 ml eine positive Agglutination zeigen. Bei IgA-Konzentrationen über 150 mg/100 ml kann aufgrund eines Prozonephänomens ((Antigen-Überschuß) eine Agglutination ausbleiben; deshalb muß man jede Serumprobe auch in einer 1 : 10-Verdünnung in der Zweiphasenreaktion testen. Mit dem IgA-Latex-Test können also rasch und einfach einerseits IgA-Mangelzustände (Einphasenreaktion), andererseits IgA-Werte über 2 mg/100 ml (Zweiphasenreaktion), die bis zum 5. Lebenstag den Verdacht einer Infektion anzeigen, erfaßt werden.

Durchführung

Material

1. Testplatte und Rührstäbchen,
2. Pipette 1 ml,
3. Mikroliterpipetten 10 und 20 μ l,
4. Latex-IgA-Reagenz (BEHRING-WERKE),
5. Anti-IgA-Pufferlösung (BEHRING-WERKE),
6. physiologische Kochsalzlösung,
7. Probandenserum.

Alle Testreagenzen sind vor Ansetzen des Tests auf Zimmertemperatur zu bringen; der Gerinnungsvorgang der Seren muß abgeschlossen sein. Zur Herstellung einer 1 : 10 Serumverdünnung wird physiologische Kochsalzlösung benutzt. Die Reagenzien sind vor Benützung gut durchzuschütteln.

Einphasen-Reaktion: 20 μ l unverdünntes Probandenserum + 20 μ l Latex-IgA-Reagenz. Die Reaktion kann schon nach kurzer Zeit (5 Minuten; nur bei Personenphänomenen kann es bis zu 10 Minuten dauern) abgelesen werden.

Zweiphasen-Reaktion: 20 μ l unverdünntes Probandenserum bzw. 20 μ l 1 : 10 verdünntes Probandenserum + 20 μ l Anti-IgA-Pufferlösung. Nach guter Durchmischung mit den Rührstäbchen sollte man den Objektträger 1 Minute rotierend bewegen; hierauf werden 20 μ l Latex-IgA-Reagenz zugesetzt. Nach Vermischung mit einem Rührstäbchen wird die Testplatte routierend bewegt. Die Reaktion kann meist schon nach 5 Minuten abgelesen werden; man sollte aber 10 Minuten warten, um Werte, die im Schwellenbereich liegen, mitzuerfassen.

AbleSEN: Von positiver Reaktion sprechen wir, wenn eine grobflockige Agglutination (beginnend im Zentrum des Ansatzes) oder eine feinkörnige Flockulation (beginnend am Rand) zu sehen ist.

Manchmal, besonders im Bereich des Schwellenwertes der Zweiphasenreaktion oder bei Prozononphänomenen, ist die Entscheidung, ob die Reaktion als positiv oder negativ zu bezeichnen ist, schwer. Es empfiehlt sich in solchen Fällen auf einem der 6 Felder der Testplatte eine Negativkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung anzusetzen, um einen direkten optischen Vergleich zu ermöglichen. Eine solche Negativkontrolle sollte man auch zu Beginn eines jeden Arbeitstages mit Latex-IgA-Reagenz durchführen, um unspezifische Agglutinationen auszuschließen.

2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Spülflüssigkeiten ist aus methodischen Gründen nicht ganz einfach.

Da diese Sekrete relativ eiweißarm sind, ist vor der Messung eine Einengung nötig; nach der Konzentrierung ist nur noch wenig Material vorhanden. Deshalb muß die anzuwendende Methode empfindlich und materialsparend sein.

Eine weitere Schwierigkeit ist die Standardisierung. Bei den meisten Methoden wird gegen Serumproteine oder gegen Albumine geeicht, obwohl sich die Protein-Zusammensetzung von Serum und Tracheobronchialsekret stark unterscheidet. Zwei Methoden wurden schließlich auf ihre Eignung überprüft.

A. Ultramikro-Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in biologischem Material nach L. STRAUCH (88)

Dieses Verfahren ist eine einfache kolorimetrische Ultramikro-Methode zur Bestimmung von KJELDAHL-Stickstoff in biologischem Material. Die Proben werden in Reagenzgläsern in einem Thermoblock bei 320°C mit Hilfe eines Oxydationsreagenz (2g Selen in 250 ml konzentrierter Schwefel-

säure + 250 ml gesättigte Kaliumsulfatlösung) aufgeschlossen, mit Wasser verdünnt, direkt nesslerisiert und kolorimetrisch ausgewertet. Die Methode kann im Bereich von $1\mu\text{g}$ bis $1700\mu\text{g}$ Stickstoff angewandt werden.

B. Eiweißbestimmung nach FÜHR und HINZ (25, 26, 60)

Beim Vergleich dieser Methode mit der unter A genannten, ergeben sich weitestgehende Übereinstimmungen in den gemessenen Proteinkonzentrationen. Wegen der einfacheren Durchführbarkeit und dem noch geringeren Materialverbrauch wird der Bestimmung nach FÜHR und HINZ der Vorzug gegeben.

Reagenzien:

- a. Gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B (MERCK) in einer Mischung von einem Teil Eisessig und 9 Teilen Methanol, vor Gebrauch filtrieren.
- b. Waschflüssigkeit: Mischung von 1 Teil Eisessig und 9 Teilen Methanol.
- c. 0,1 n NaOH

Ausführung

In ein graduiertes Zentrifugenglas werden 1 ml Aquadest. und 50 bzw. $20\mu\text{l}$ eingeengtes Sekret einpipettiert. Hinzufügen von 5 ml Reagenz a, gut durchmischen, 20 Minuten reagieren lassen. Abzentrifugieren des angefärbten Eiweißniederschlags (10 Minuten, 3.500 U/Min); vorsichtiges Dekantieren der überstehenden Färbelösung. Auswaschen des Niederschlags mit Lösung b und Zentrifugieren wie oben mehrmals bis zur Farblosigkeit der überstehenden Lösung. Auflösen des tiefblauen Eiweißniederschlags in 0,1 n NaOH durch Auffüllen auf 5 ml und Vermischen mit einem Glasstab. Ablesen der Extinktion bei einer Schichtdicke von 1,0 cm und 610 nm (Spektralphotometer Fa. ZEISS)

Berechnung: $C = E \times 210$ für 100μ Probe. Der Faktor 210 wird mit Serumverdünnungen, die mit der Biuretmethode gemessen werden, bestimmt. Der Eichfaktor, der schon in der Literatur (60) angegeben wird, wird erneut kontrolliert und bestätigt. Proben, bei denen sich eine Extinktion größer 1,5 ergibt, werden verdünnt und der Versuch mit den Verdünnungen wiederholt.

Bei jedem Untersuchungsgang (meist 12 Sekrete) wird eine Probe mit einer schon bekannten Eiweißkonzentration als Kontrolle mitgeführt. Kommt es bei einem Versuch zu einer Abweichung der Kontrolle von mehr als 10%, so wird die Messung aller 12 Proben ein zweites Mal durchgeführt.

3. Einfache radiale Immundiffusion (RID) nach MANCINI (52)

Mit dieser Methode ist die quantitative Bestimmung von Proteinen möglich.

Es handelt sich hierbei im Prinzip um die Diffusion eines Antigens (zu bestimmendes Protein) in ein mit homologem Antiserum versehenes Gel; dabei kommt es zur Ausbildung eines zylindrischen Immunpräzipitats. Der Durchmesser ist nach beendeter Diffusion der Antigenkonzentration proportional, wenn der vorgegebene Antikörpergehalt im geeigneten Verhältnis zur variablen Antigenkonzentration steht. Bei den durchgeführten Untersuchungen werden zum Teil handelsübliche, gebrauchsfertige Antiserum-Agargel-Immundiffusions-Platten (LC, S-, M-, Tri-Partigen-Immundiffusionsplatten, BEHRINGWERKE) verwendet.

Für einige Eiweiße (z.B. Secretory-Component, Lactoferrin) sind solche Platten aber nicht käuflich zu erwerben oder sie sind zu unempfindlich, um Proteine in eiweißarmen Sekreten messen zu können (z.B. Coeruloplasmin, α_2 -Macroglobulin,

β_1 A-Globulin)

In diesen Fällen werden die Platten selbst angefertigt.

Herstellung der Agargelplatten (4)

Zunächst wird eine Diäthylbarbiturat-Pufferlösung pH 8,6 nach MICHAELIS folgendermaßen hergestellt: Zu 100ml einer 0,1 M Natrium-diäthylbarbiturat-Lösung (20,6g ad 1.000ml dest.Wasser) fügt man 14,8 ml 0,1 N Salzsäure und stellt den pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure bzw. Natronlauge genau auf 8,6 ein.

Agar purum (BEHRINGWERKE) wird in der Pufferlösung auf dem siedenden Wasserbad gelöst und ein Konservierungsmittel (z.B. 0,1% Thiozid) zugegeben. Die heiße Agarlösung läßt man in einem Wasserbad auf 50°C abkühlen und mischt sie gründlich mit dem kurz vorher auf 48°C vorgewärmten spezifischen Antiserum. Petri-Schalen mit absolut ebener Innenfläche werden auf einer Heizplatte von etwa 60°C vorgewärmt und dann in völlig waagrechter Lage mit einer konstanten Menge der warmen Antiserum-Agar-Lösung beschickt. Die Mischung wird durch vorsichtiges Kippen gleichmäßig auf die gesamte Fläche verteilt. Nach kurzem Stehenlassen bei Raumtemperatur erstarrt die Lösung zu einer gleichmäßig dicken Gelschicht. In die Schicht werden mit Stanzkanülen (BEHRINGWERKE) Löcher einheitlicher Größe gestanzt.

Die fertigen Antiserum-Agargel-Platten können, mit einem Deckel versehen, in einer feuchten Kammer bei etwa 4°C aufbewahrt werden.

Um Eiweiße in Sekreten messen zu können, müssen die selbstgegossenen Immundiffusionsplatten empfindlicher sein im Vergleich zu den käuflichen, die auf eine Proteinmessung im Serum ausgerichtet sind.

Dies kann erreicht werden durch

- a. Reduktion der Agarkonzentration von 2% auf 1%
- b. Erhöhung des Einfüllvolumens der Probe von 5 auf 10 μ l
- c. Erhöhung der Dicke der Gelschicht von 1,5 mm auf 2,5 mm
- d. Vergrößerung des Durchmessers der eingestanzten Löcher von etwa 1,5 mm auf 2,5 mm
- e. Verminderung der Antikörperkonzentration im Gel (je nach Antiserum verschieden) von 5-15% auf 0,8-2%

Durchführung der Bestimmung

Zum Einfüllen der Proben in die Stanzlöcher der Agar-schicht werden je nach Platte entweder eine Mikroliter-spritze HAMILTON ($5\mu\text{l}$) oder eine EPPENDORF-Pipette ($10\mu\text{l}$) verwendet. Mindestens drei verschiedene Verdünnungen eines Standards sind nötig, um eine Eichkurve aufstellen zu können. Die Meßergebnisse können nach abgeschlossener Diffusion (48 - 72 Stunden nach dem Einfüllen) abgelesen werden. Während dieser Zeit wird die Platte gut verschlossen bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Bei den käuflichen Platten ist das Ablesen des Präzipitatchurchmessers nach 48 - 72 Stunden gut möglich. Schwieriger ist dies jedoch bei den selbstgegossenen Platten, die speziell für niedrige Eiweißkonzentrationen angefertigt werden. Hier ist eine Behandlung mit Tannin zu empfehlen.

Bessere Sichtbarmachung der Präzipitate durch Tannin (MERCK) (81)

Nach vollständig erfolgter Diffusion wird die Platte mit physiologischer Kochsalzlösung mindestens 24 Stunden lang, bei hoher Begleitprotein-Konzentration 2 - 3 Tage lang ausgewaschen. Mehrmaliges Wechseln der Waschflüssigkeit und ständiges Rühren (Magnetrühren) beschleunigt die notwendige Entfernung nicht präzipitierter Proteine aus dem Agargel. Nach dem Waschvorgang übersichtet man die Gelfläche 30 Minuten lang mit einer 4% igen, wäßrigen Tannin-Lösung. Die nun sichtbaren Präzipitate können noch verbessert werden, indem man die Platte für einige Zeit in dest. Wasser legt. (Abb. 4)

Ablesen

Das Ablesegerät, eine mit Zehntelmillimetereinteilung versehene Lupe wird zur Messung auf die Platte gelegt, die von unten her mit schräg einfallendem Licht beleuchtet wird. Es kann bis auf 0,1 mm genau abgelesen werden.

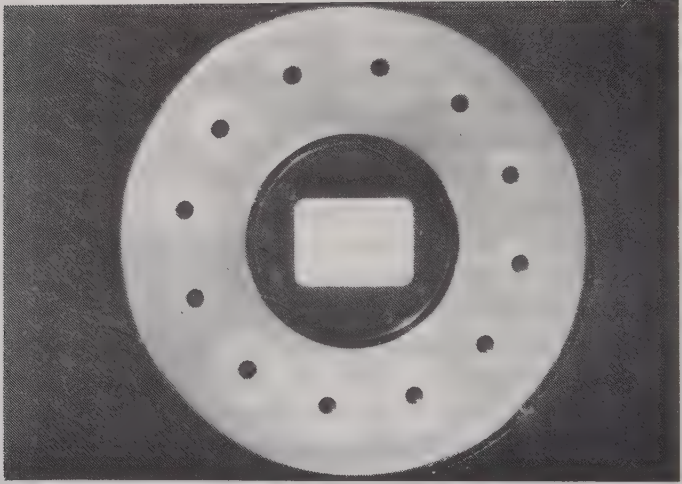


Abb. 4: Anti-IgA-Immundiffusionsplatte (LC-Partigen BEHRINGW.)
Die Immunpräzipitate wurden durch Behandlung mit Tannin
besser sichtbar gemacht.

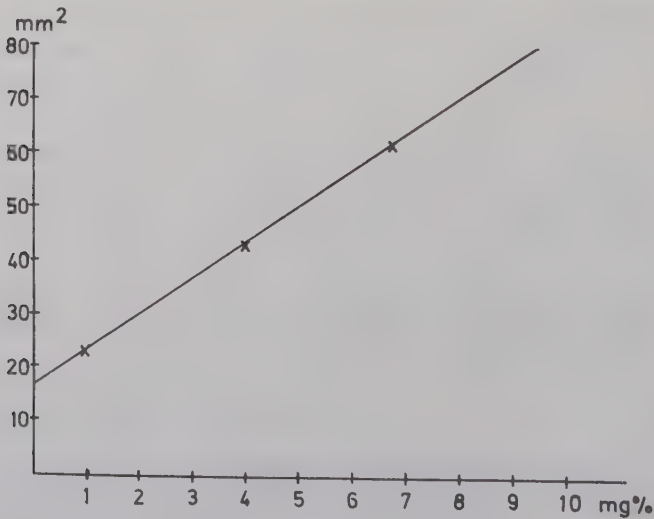


Abb. 5: Eichkurve zur quantitativen IgA-Bestimmung mit der
MANCINI-Technik (LC-Partigen-Immundiffusionsplatte,
BEHRINGWERKE). Die 3 Bezugspunkte erhält man mit Ver-
dünnungen eines Standardserums.

Trägt man die Kreisfläche πr^2 (= Fläche der Auftragsstelle + Fläche des Präzipitats) als Funktion der Antigenmenge Q_{Ag} (= Antigenkonzentration x Volumen der Antigenlösung) in einem Koordinationssystem auf, so resultiert eine gradlinige Beziehung.

$$\pi \cdot r^2 = K \cdot Q_{Ag} + S$$

Der Schnittpunkt S der Geraden mit der Ordinate stellt eine Funktion der Größe der Auftragsstelle dar, die Steigung K ist umgekehrt proportional der Antiserumkonzentration im Gel sowie dessen Schichtdicke.

Da bei den Bestimmungen die Größe der Auftragsstelle, die Schichtdicke und die Antiserumkonzentration konstant gehalten wird, zudem immer das gleiche Volumen eingefüllt wird, läßt sich vereinfacht eine direkte Beziehung zwischen Antigenkonzentration und Präzipitattendurchmesser aufstellen; graphisch dargestellt ergibt sich eine nach oben gebogene Kurve, die bei Quadrierung der Ordinatenwerte in eine Gerade übergeht. (Abb. 5)

4. Geldiffusions-Plattentechnik nach OUCHTERLONY (72, 73)

Bei dieser Methode diffundieren Antigen und Antikörper gegeneinander, jedes von einem eigenen Loch aus, das in eine dünne Agarschicht gestanzt wird. Am Ort der höchsten Konzentration der Lösungen entwickelt sich im Gel ein Präzipitat. Diese zweidimensionale Immundiffusion wird zum Nachweis von Proteinen und zur Reinheitsprüfung von Proteinlösungen eingesetzt. Durch Verdünnen der Antigenlösungen sind auch halbquantitative Aussagen möglich.

Aus den Mustern, die sich aus den Präzipitationslinien ergeben, kann eine der drei Aussagen gemacht werden.

1. Zwei Proteine sind vollständig identisch
2. Zwei Proteine sind nicht identisch
3. Zwei Proteine sind teilweise identisch

Näheres ist der Abb.(6) zu entnehmen.

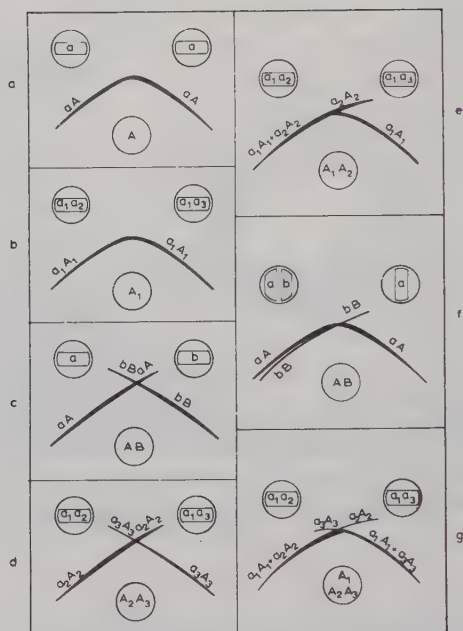


Abb. 6
(74)

Bedeutung der Präzipitate, die man mit der OUCHTERLONY-Methode erhält

Die kleinen Buchstaben beziehen sich auf die Antigen-Determinanten. Die Determinanten, die zu einem Molekül gehören, sind eingekreist. Große Buchstaben bezeichnen die zugehörigen Antikörper.

- Muster einer vollständigen Identität der Antigene
- Muster einer vollständigen Identität, erhalten mit verwandten, aber nicht gleichen Proteinen
- Muster einer Nicht-Identität
- Muster einer Nicht-Identität, erhalten mit antigenetisch verwandten Proteinen
- Muster einer teilweisen antigenetischen Identität, die einen einzelnen "Sporn" bildet
- Ein Loch (links) enthält zwei verschiedene Proteine, von denen eines auch im rechten Loch vorhanden ist; überlagern sich zufällig die beiden Loch Präzipitate, so entsteht ein "falscher Sporn"
- Muster einer teilweisen antigenetischen Identität, die zwei "Sporne" bildet.

Herstellung der Diffusionsplatten

Beschreibung des Puffers nach MICHAELIS siehe Seite 22. Agar purum (BEHRINGWERKE) wird zu 1% in der Pufferlösung auf dem siedenden Wasserbad gelöst und ein Konservierungsmittel (z.B. 0,1% Thiozid) zugegeben. Die heiße Agarlösung schüttet man auf eine völlig waagrechte Glasplatte; die Dicke der Agarschicht soll etwa 2 - 2,5 mm betragen. Nach dem Erkalten werden Löcher in den Agar gestanzt, die das Antigen bzw. den Antikörper aufnehmen können. Von diesen wird je 10 μ l eingefüllt. Nach einer Diffusionszeit von 48 - 72 Stunden werden die Platten zur besseren Sichtbarmachung der Präzipitate mit Tannin behandelt (wie auf Seite 23 beschrieben).

5. Zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL (48), modifiziert nach CLARKE und FREEMAN (21)

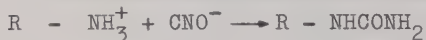
Prinzip

Die zweidimensionale Immunelektrophorese ist eine Kombination von Agargel-Elektrophorese und Elektroimmundiffusion. In der ersten Phase werden Proteine in einem antikörperfreien Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nun legt man, senkrecht zur ursprünglichen Wanderungsrichtung, eine Spannung an, wodurch die einzelnen Fraktionen des Pherogramms unter Ausbildung von gausskurvenförmigen Immunpräzipitaten in das antikörperhaltige Agarose-Gel anodenwärts wandern. Jedes Protein-Antigen, das hierbei in annähernd äquivalenten Konzentrationen auf seinen korrespondierenden Antikörper trifft, bildet mit diesem zusammen ein gausskurvenförmiges Immunpräzipitat. Die Fläche unter dem Präzipitat ist der Antigenmenge direkt proportional.

$$\text{Fläche} = K \times \frac{\text{Antigenkonzentration}}{\text{Antikörperkonzentration im Gel}}$$

Die Methode ist geeignet, vor allem Proteine der α - und β -Fraktion quantitativ zu bestimmen. γ -Globuline hingegen können in dieser Weise nicht untersucht werden, da sie im Gegensatz zu α - und β -Globulinen auf Grund der Elektro-Endosmose auch kathodenwärts wandern.

Das Problem kann gelöst werden, indem die Wanderungsrichtung der Proteine verändert wird. Die Motilität der menschlichen Immunglobuline kann durch Carbamylierung mit KCNO so verändert werden, daß sie bei pH 8,6 ausschließlich anodisch wandern (22,86,103,104). Die Cyanate reagieren mit den α - und ϵ -Amino- und Sulfhydryl-Gruppen der Proteine und senken so deren isoelektrischen Punkt.



Durchführung

Carbamylierung (104)

1 Teil zu untersuchende Probe + 2 Teile 2 M KCNO reagieren bei Raumtemperaturen etwa 18 Stunden lang.

Puffer:

Sowohl für die Gelherstellung als auch für die Elektrophoresekammer wird Barbitalpuffer pH 8,6 verwendet. 41,2 g Barbitat-Natrium (5,5 - Diäthylbarbitursäure-Natrium-Salz) + 8,0 g Barbitat (5,5 - Diäthylbarbitursäure) werden mit destilliertem Wasser auf 10 l aufgefüllt. Die Ionenstärke μ dieses Puffers beträgt 0,02.

1. Dimension:

- a. auf einer 5 x 5 cm großen Glasplatte werden 4 ml 1%ige heiße Agaroselösung in Barbitalpuffer pH 8,6 $\mu = 0,02$ ausgegossen.
- b. nach dem Erkalten wird in einer Entfernung von etwa 0,5 cm vom rechten und etwa 0,5 cm vom unteren Rand der Glasplatte ein Loch als Antigen-Reservoir (Durchmesser 2,5 mm) ausgestanzt.
- c. in dieses werden je nach zu untersuchender Probe 5 - 20 μ l Probe eingefüllt.

- d. hierauf wird die Agarose-Gelplatte in die Elektrophoresekammer gelegt und die Proteine der untersuchten Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Es empfiehlt sich bei einer Probe Kongorot oder Bromphenolblau mitlaufen zu lassen, um eine Sichtkontrolle der Wanderungsstrecke eines schnell wandernden Proteins zu haben.

Zum Kontakt zwischen Gel und Elektrophoresekammer dienen 1 mm dicke Filterpapierstreifen (SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 2668)

Elektrophoresebedingungen

Zu den Auftrennungen benützen wir Geräte der Firma DANSK, LABORATORIEUDSTYR, Kopenhagen

Puffer in der Elektrophoresekammer: Barbitalpuffer pH 8,6
 $\mu = 0,02$

Angelegte Spannung: 220 - 280 V

Feldstärke: 9 - 10 V/ cm

Stromstärke pro Kammer (belegt mit 4 Platten 5 x 5 cm):
60 - 90 mA

Elektrophoresedauer: ca. 60 Minuten unter Wasserkühlung

- e. nach Beendigung der Elektrophorese schneidet man einen Teil der Gelschicht so ab, daß nur ein schmaler Gel-Streifen mit dem Pherogramm (ca. 1 cm) auf der Glasplatte zurückbleibt.

2. Dimension

- a. Unter Verwendung eines Horizontaltisches als ebene Arbeitsfläche werden nun 3 ml 1%ige 55°C warme antikörperhaltige Agaroselösung in Barbitalpuffer pH 8,6 $\mu = 0,02$ auf dem restlichen Teil der Glasplatte ausgegossen.
- b. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird die Platte zur Durchführung des im rechten Winkel zur ersten Elektrophorese-richtung verlaufenden zweiten Elektrophoreseschrittes auf die Trägerplatte der Apparatur zurückgelegt. Mit 1 mm dicken Filterpapierstreifen stellt man den Kontakt zu den Pufferträgern her, die wieder Barbitalpuffer pH 8,6 $\mu = 0,02$ enthalten.

Elektrophoresebedingungen

Angelegte Spannung: 70 - 80 V

Feldstärke: 2 V / cm

Stromstärke: 10 - 15 mA

Elektrophoresedauer: ca 16 - 18 Stunden unter Wasser-
kühlung

Auswaschen, Trocknen, Färben

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele für etwa 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

Nun können die Gele mit Tannin behandelt oder aber gefärbt werden.

Hierzu wird ein mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteter Filterpapierstreifen so auf die Gelschicht gelegt, daß sich keine Luftblasen bilden. Darauf kommt eine 2 cm dicke Zellstoffschicht, eine Glasplatte und ein Zweikilogramm. Man läßt diese ungefähr 10 - 15 Minuten einwirken. Auf diese Weise werden die nicht an der Immunpräzipitation beteiligten Proteine herausgepreßt und von der Zellstoffschicht aufgesaugt.

Nach dem Auspressen wird der Gelfilm mit Warmluft getrocknet, bis er durchsichtig geworden ist.

Nun wird die Glasplatte mit dem Gelfilm 2 - 3 Minuten zur Anfärbung der Immunpräzipitate in eine Coomassie-Färbelösung gelegt.

Dann wird dreimal 2 Minuten - jeweils in frischer Entfärbelösung - entfärbt.

Coomassie-Färbelösung: Coomassie Brilliant Blue R 250 5,0g
(SERVA Heidelberg)

Äthanol 96% 450,0 ml

Eisessig 100,0 ml

Dest. Wasser 450,0 ml

Entfärbelösung: Äthanol 96% 450,0 ml

Eisessig 100,0 ml

Dest. Wasser 450,0 ml

Auswertung

In einem Antiserum, das Antikörper gegen mehrere Proteine enthält, sind die Titer gegen die verschiedenen Proteine unterschiedlich. Deshalb darf nicht angenommen werden, daß ein großes Immunpräzipitat (" Peak ") eine große Proteinkonzentration des betreffenden Eiweißes in der Probe bedeutet. Zur Quantifizierung muß deshalb bei jeder Bestimmung ein Standard mitgeführt werden. Dieser sollte im Idealfall aus einer bekannten Menge des isolierten Proteins, das bestimmt werden soll, bestehen.

Um nun eine quantitative Aussage machen zu können, müssen die Flächen unter den Peaks gemessen werden. Dies kann auf verschiedene Weise geschehen.

Wir übertragen die Umrissse der Peaks auf einen Bogen Papier, der stets von gleicher Qualität ist. Der gezeichnete Peak wird dann ausgeschnitten, gewogen und mit dem Standard-Peak verglichen.

Das ermittelte Gewicht ($\propto$ Fläche des Peaks) ist der Menge des Antigens, d.h. des zu messenden Proteins, direkt proportional.

Die Fläche der einzelnen Peaks kann ebenso durch Planimetrieren ermittelt werden.

6. Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese -Disk-Elektrophorese (56,71,97)

Prinzip

Die Disk-Elektrophorese ermöglicht eine Analyse von Proteinen mit ungewöhnlicher Trennschärfe. Die Trennung erfolgt elektrophoretisch und auf Grund des Molekularsieb-Effektes in kontinuierlichen, homogenen Systemen.

Durchführung

Elektrodenpuffer: Tris-Glycin-Puffer pH 9,0

(3g Tris + 14,4g Glycin auf 1.000ml
H₂O dest. mit 1n NaOH auf pH 9,0 bringen)

Gelpuffer: 0,33M Tris-Puffer-pH 8,0

(40,0g Tris auf 1.000ml H₂O dest mit 1N HCl auf
pH 8,0 bringen)

- Gel: 1. 15g Acrylamid +400mg N,N'-Methylenbisacrylamid (SERVA) werden bis zu 50,0ml im Gelpuffer gelöst
2. 0,8ml DMAFN (-Dimethylaminopropionitril)(SERVA) gelöst in 50,0ml Gelpuffer
3. 15mg Kaliumferricyanid K₃Fe(CN)₆ (SERVA) gelöst in 50,0ml Gelpuffer
4. 240mg Ammonpersulfat (NH₄)₂S₂O₈ (MERCK) gelöst in 50,0ml Gelpuffer

Alle 4 Lösungen werden im Verhältnis 1:1 gemischt, in Glasröhrchen gefüllt und mit deionisiertem Wasser überschichtet. Unter Luftabschluß erfolgt die Polymerisation. Als Katalysatoren, die die Polymerisation einleiten, dienen das Ammonpersulfat, Dimethylaminopropionitril und das Kaliumferricyanid. Bei allen Trennungen wird eine Gelkonzentration von 7,5% verwendet.

Von der zu trennenden Proteinlösung werden, nach vorausgegangener Mischung mit einer Spatelspitze Glucose, 20 µl direkt auf das polymerisierte Trenngel aufgetragen.

Die Trennung selbst erfolgt in dem Gerät ACRYLOPHOR der Fa. PLEUGER

Bei jedem einzelnen Lauf werden in 8 Polyacrylamid-Gel-Röhrchen von etwa 7cm Länge die Proteine aufgetrennt. In beide, ein oberes und unteres Elektrodengefäß, wird Elektrodenpuffer eingefüllt. In das obere Elektrodengefäß wird etwas Bromphenolblau gefüllt, um an Hand der entstehenden Bande die Wanderung des Albumins verfolgen zu können:

Spannung: 70 V

Stromstärke: 40 - 50 mA $\pm$ 5 - 6 mA pro Röhrchen

Laufzeit: etwa 2 Stunden

Im Anschluß an die elektrophoretische Trennung erfolgt die Herauslösung der Gele aus den Glasröhrchen mit Hilfe einer langen Injektionsnadel.

Färben, Entfärben

Färbelösung (28, 61): Coomassie Brilliant Blue R 250 (SERVA) wird zu 0,25% in 20% Trichloressigsäure gelöst.

Die Gele bleiben für etwa 2 Stunden in der Färbelösung

Entfärber: 7% Essigsäure

Der Entfärbevorgang ist langwierig und kann durch oftmaliges Wechseln der Entfärberlösung beschleunigt werden.

Nach der Entfärbung sind die einzelnen Proteinbanden klar abzugrenzen.

Neben dieser Proteinfärbung wird auch noch eine Färbemethode angewandt, die Kohlenhydrat-Protein-Komplexe erfäßt (20). Dabei wird das Rundgel nach der Elektrophorese für eine Stunde bei Raumtemperatur in 7,5% Essigsäure gelegt, hierauf ebenfalls für eine Stunde bei 0 - 4°C in 0,2% Perjodsäure. Das Gel wird dann einige Male mit 15% Essigsäure gespült und bei 0 - 4°C in Schiff's Reagenz gelegt. Die Entfärbung erfolgt mit 7,5% Essigsäure (1-2 Std.) Die Stellen, die Kohlenhydrate enthalten, sind nun rot angefärbt.

Auswertung

Die Gele der verschiedenen Proben können nun auf Anzahl und Intensität der einzelnen Banden hin verglichen werden. Eine objektive Messung kann durch eine densitometrische Auswertung erreicht werden. Hierbei werden die Gele mit gleichbleibender Geschwindigkeit durch einen Lichtstrahl gezogen, wobei eine Photozelle die unterschiedlichen optischen Dichten registriert.

Identifizierung einzelner Proteinbanden(97)

Dies kann geschehen, indem man an die Disk-Elektrophorese eine Immunpräzipitation anschließt. Nach einem elektrophoretischen Lauf wird ein Gelröhrchen mit Coomassie-Blue angefärbt. Die anderen Röhrchen, in denen das gleiche Proteingemisch aufgetrennt wurde, werden auf Glasplatten in einen Agar eingebettet. In diesen schneidet man, parallel zu dem PAA-Gel, Rinnen, die mit Antiserum gefüllt werden. Die elektrophoretisch getrennten Proteine wandern aus dem PAA-Gel in den Agar, das Antiserum diffundiert in den Agar. Am Treffpunkt von Ag und Ak bildet sich ein Immunpräzipitat. Nachdem sich das Präzipitat nach zwei bis drei Tagen in einer feuchten Kammer entwickelt hat, wird es, wie schon beschrieben, in phys. NaCl gewaschen, gefärbt oder mit Tannin behandelt. Werden monospezifische Antiseren verwendet und die Lage der Präzipitate mit den Banden des gefärbten Gelröhrchens verglichen, so kann die Identifizierung einiger der Proteinbanden erfolgen.

IV. Ergebnisse und Diskussion

1. IgA-Latex-Test

A. Ergebnisse (74)

Zur Erprobung des IgA-Latex-Testes untersuchten wir 160 Seren (80 Nabelvenenseren, 80 nach Altersgruppen ausgewählte Seren von Kindern) sowohl mit der Latex-Methode als auch mit der konventionellen IgA-Gel-Methode (einfache radiale Immundiffusion nach MANCINI).

Für die radiale Immundiffusion wurden käufliche Platten der BEHRINGWERKE (Tri-Partigen-IgA-Platten bzw. LC-Partigen-IgA-Platten) verwendet. Eine bessere Darstellung der Immunpräzipitate bei LC-Platten konnte durch Behandlung mit Tannin erreicht werden (81).

Mit jedem unverdünnten Serum führten wir die Einphasen- und die Zweiphasenreaktion des IgA-Latex-Testes durch. Da aber in der Zweiphasenreaktion sowohl Seren mit weniger als 2mg / 100 ml IgA als auch, auf Grund eines Prozonon-Phänomens, solche mit hohen IgA-Konzentrationen (über 100mg/ 100ml) keine Agglutination zeigen, wurde die Zweiphasenreaktion auch mit einer 1 : 10 Serumverdünnung angesetzt. Bei Werten < 2mg / 100ml reagierte diese Verdünnung negativ, während sie bei Antigenüberschuß (Prozononphänomen positiv ausfiel.

Einphasen-Reaktion

Die Einphasen-Reaktion war bis auf 8 Seren immer positiv. Die IgA-Konzentrationen dieser 8 Seren lagen, wie sich mit der 1 : 10 Zweiphasen-Reaktion und der IgA-Gel-Methode zeigte, im Prozononbereich. Das IgA-Latex-Reagenz agglutiniert noch bei IgA-Konzentrationen unter 0,4mg / 100ml, ist also, verglichen mit der Mancinitechnik, höchst empfindlich.

Obwohl wir mit den Lc-Partigen-Platten eine sehr brauchbare Methode, die noch Konzentrationen bis zu 0,4mg/100 ml deutlich anzeigte, zur Hand hatten, konnten etliche IgA-Werte, die in der Einphasen-Reaktion positiv reagierten (IgA ist vorhanden), mit der Gel-Methode nicht mehr erfaßt werden.

Zweiphasen-Reaktion

Die Zweiphasen-Reaktion wurde auf einen Schwellenwert von 2 mg/100 ml eingestellt. Unter den 160 untersuchten Seren war kein falsch-positives und nur ein falsch-negatives Ergebnis (entsprechend 2,8 mg/100 ml) zu finden (Abb. 7). 8 Proben mit IgA-Konzentrationen zwischen 150 mg/100 ml und 384 mg/100 ml zeigten in der unverdünnten Zweiphasen-Reaktion keine sichtbare Agglutination; diese Reaktionen konnten aber als Prozononphänomene "entlarvt" werden, da die 1 : 10 Zweiphasen-Reaktion eindeutig positiv war. Diese Ergebnisse entsprechen einer Treffsicherheit des IgA-Latex-Tests von über 99%.

Fehlerbreite

Zur Ermittlung der Fehlerbreite im Bereich des Schwellenwertes wurden Seren mit bekannten Serum-Konzentrationen so verdünnt, daß in den jeweiligen Verdünnungsstufen der IgA-Gehalt 0,5 bis 80 mg/100 ml betrug.

Mit diesen 57 Serumproben führten wir die Zweiphasen-Reaktion und die quantitative Bestimmung mit der Partigen-Platte durch. Es ergaben sich keine falsch-positiven Ergebnisse, aber 10 falsch-negative mit IgA-Werten von 2,05 - 3,4 mg/100 ml (Abb. 8).

Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich ein IgA-Schwellenwert von 3,0 mg/100 ml mit einer Abweichung von $\pm 0,5$ mg/ 100 ml. Bei Konzentrationen, die im Bereich des Schwellenwertes liegen, soll die Ablesung der Reaktion erst nach 10 Minuten erfolgen, aber auch nicht später, da dann die Gefahr einer falsch-positiven Ablesung durch Eintrocknung besteht.

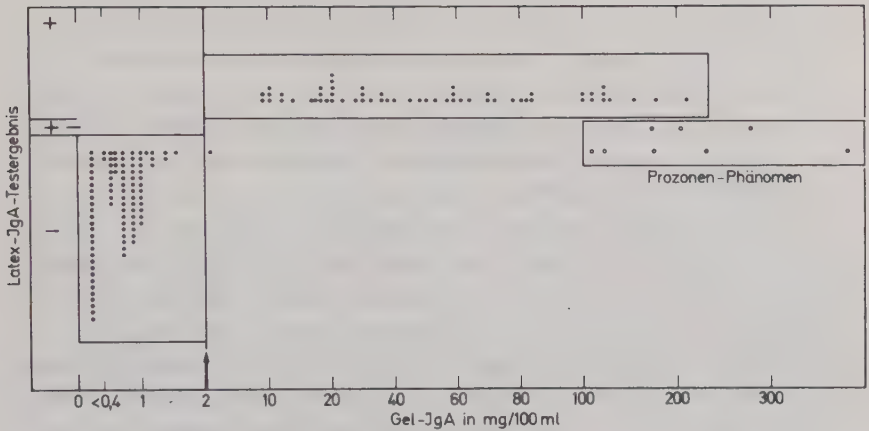


Abb. 7 Treffsicherheit des IgA-Latex-Tests (74)
Der Pfeil auf der Abszisse markiert den Schwellenwert. Auf der Ordinate werden die Testergebnisse als positiv (+), fraglich (+ -) und negativ (-) aufgetragen.

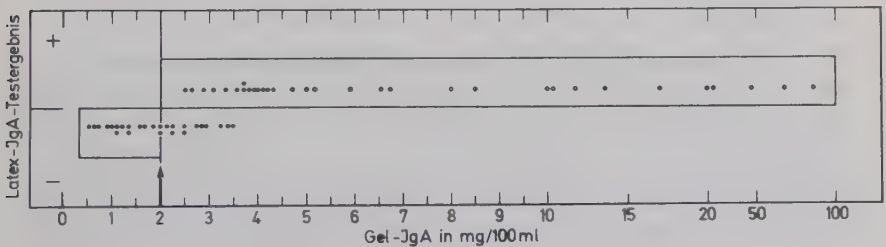


Abb. 8 Bestimmung der Fehlerbreite und des Schwellenwertes des IgA-Latex-Tests (74)
Der Pfeil auf der Abszisse markiert den Schwellenwert. Auf der Ordinate werden die Testergebnisse als positiv (+) und negativ (-) aufgetragen.

Legt man diese Variationsbreite von $3,0 \pm 0,5$ mg/100 ml den Ableseergebnissen der 160 mit dem Latex-Reagenz getesteten Seren zu Grunde, so liegt auch der falsch-negative Wert (2,8 mg/100 ml) innerhalb des angegebenen kritischen Grenzbereichs.

Es wurde auch die Anwendbarkeit des IgA-Latex-Testes als qualitative oder semiquantitative Bestimmungsmethode in anderen biologischen Flüssigkeiten geprüft.

76 Tracheobronchialsekrete bzw. Spülflüssigkeiten des Tracheobronchialsystems untersuchten wir mit der Einphasen-Reaktion. Hierzu wurden die Sekrete nur zentrifugiert und der Überstand für den Test verwendet.

75 Sekrete enthielten, wie ein positives Testergebnis zeigte, IgA. Nur bei einem Patienten fiel die Reaktion negativ aus; bei diesem Kind ist ein selektiver IgA-Mangel bekannt. Einschränkend ist jedoch zu bemerken, daß mit dem IgA-Latex-Test nicht zwischen 7s-Serum-IgA, das bei entzündlichen Prozessen durch erhöhte Transsudation aus dem Serum vermehrt in den Sekreten zu finden ist, und dem Schleimhaut-11s-IgA unterschieden werden kann.

B. Diskussion

Der IgA-Latex-Test hat vor der konventionellen Immundiffusionsmethode nach MANGINI et a. (52) den Vorteil, daß er bei geringem Arbeits- und Zeitaufwand überall ohne besondere Laboreinrichtung durchgeführt werden kann. Bei der einfachen radialen Immundiffusionsmethode mit der die quantitativen Bestimmungen der IgA-Serum-Konzentrationen bisher durchgeführt werden, ist die Mindestdiffusionszeit 16 - 18 Stunden, die bis zum Ablesen der Ergebnisse abgewartet werden muß. Hingegen sind mit der IgA-Latex-Methode semiquantitative Ergebnisse schon nach 5 - 10 Minuten verfügbar. Für diesen Test ergeben sich folgende Anwendungsmöglichkeiten:

1. Screening-Test in der Neonatologie

Da die maximale IgA-Konzentration im Nabelvenenblut bei 2 mg/100 ml liegt (97,98), enthält die hier ermittelte Variationsbreite von $3,0 \pm 0,5$ mg/100 ml bereits einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor und erlaubt so, nur eindeutig über die physiologische Streubreite hinausgehende Serumkonzentrationen bei Neugeborenen vom 1. bis zum 6. Lebens- tag zu erfassen. Dadurch wird eine Selektion von Fällen, bei denen der Verdacht einer Infektion besteht, während der ersten Woche möglich. Durch seine außerordentlich hohe Treff- sicherheit, die leichte Durchführung und dem kurzen Reaktions- ablauf wird der IgA-Latex-Test (Zweiphasen-Reaktion) besonders in Verbindung mit dem IgM-Latex-Test (99) zu einer geeigneten Suchmethode bei der routinemässigen Fahndung nach Infektionen bei Neugeborenen.

2. Semiquantitative IgA-Bestimmung

Durch entsprechende Verdünnungen kann die Zweiphasen-Reak- tion als semiquantitativer Test in allen biologischen Flüssigkeiten verwendet werden, die IgA enthalten (z.B. bei einer 1 : 2 vorverdünnten Probe spricht die Zweiphasen- Reaktion erst ab 6 mg/100 ml an).

3. Qualitativer Nachweis kleinster IgA-Konzentrationen

Die Einphasen-Reaktion ist die empfindlichste Routine- methode zum Nachweis von IgA; Werte, die unter 0,4 mg/100 ml liegen, werden noch durch positive Agglutination angezeigt. So konnten wir mit diesem Verfahren in allen 80 Nabelvenen- seren IgA nachweisen, was anderen Autoren mit der Gel- Methode nur in 5% (64,1), 29,9% (13) bzw. 33% (87) ihrer Serumproben gelang. Genauso findet die Reaktion in anderen biologischen Flüssigkeiten Verwendung, wenn es darauf ankommt, sehr niedrige IgA-Konzentrationen zu erfassen. So kann z.B. bei Verdacht auf einen lokalen IgA-Mangel die Einphasen-Reaktion in Sekreten (Speichel, Urin, Stuhlauf- schwemmung usw.) durchgeführt werden und durch ihren

negativen Ausfall die Diagnose bestätigen.

Der IgA-Latex-Test hat also in der Routine überall da seinen Platz, wo es gilt, rasch und einfach kleinste Mengen von IgA nachzuweisen oder semiquantitative Untersuchungen durchzuführen.

2. Selektive quantitative Bestimmung des Sekret-11s-IgA

Das sekretorische 11s-IgA-Molekül besteht aus zwei 7s-IgA-Monomeren (Serum-IgA), der J-Kette und einem nicht zu den Immunglobulinen gehörenden Glykoprotein, der sog. sekretorischen Komponente (SC). Dieses 11-IgA macht unter physiologischen Bedingungen etwa 90% der IgA-Antikörper im Sekret aus. Unter pathologischen Bedingungen, bei entzündlichen Vorgängen, kommt es zu einer Exsudation von 7s-Serum-IgA ins Sekret.

Mit der in der Literatur weitaus am häufigsten verwendeten Bestimmungsmethode, der RID im Anti-IgA-haltigen Agargel, kann zwischen 7s- und 11s-IgA nicht unterschieden werden. Da nicht auszuschließen ist, daß gerade dem 11s-IgA mit seiner sekretorischen Komponente in den äußeren Sekreten eine Aufgabe zukommt, die vom Serum-7s-IgA nicht erfüllt werden kann, ist eine selektive Bestimmung von 11s-IgA wünschenswert. Auf diese Weise kann ein 11s-IgA-Mangel bei in ausreichender Menge vorhandenem 7s-IgA, bedingt durch eine verminderte Produktion von SC oder einem Defekt in der Kopplung von SC + IgA, entdeckt werden.

Ein derartiger Defekt kann ätiologisch für pathologische Prozesse im Bereich der Schleimhäute verantwortlich sein.

A. Ergebnisse

In dieser Arbeit wird versucht, das 11s-IgA selektiv mit einer Kombination von Geldiffusion (QUCHTERLONY), einfacher radialer Immundiffusion (MANCINI) und zweidimensionaler Immunelektrophorese (CLARKE, FREEMAN) zu messen.

Unbedingte Voraussetzung für eine quantitative, immunchemische Proteinbestimmung ist a) ein spezifisches Antiserum und b) ein Standard, d.h. im Idealfall eine Reinpräparation des zu untersuchenden Proteins, in diesem Fall des 11s-IgA.

a. Antiseren

Bei allen Untersuchungen werden Antiseren vom Kaninchen verwendet. Beim Kaninchen kommt es im Gegensatz zum Pferde-Antiserum-Typ im Antikörperüberschußbereich und in der Äquivalenzzone zur Präzipitation. Nur im Antigenüberschußbereich tritt eine verminderte Präzipitation und ein nicht präzipitierender-Antigen-Antikörper-Komplex auf. Kaninchen-antisera haben eine breite Äquivalenzzone, bei den Ag-Ak-Reaktionen kann das Mengenverhältnis von Antigen zu Antikörper sehr weit streuen. Es tritt immer noch eine maximale Immunpräzipitation auf.

Zur 11s-IgA-Messung werden drei Antisera verwendet

Anti-IgA (BEHRINGWERKE):

Dieses Antiserum reagiert spezifisch mit den schweren H-Ketten des IgA-Moleküls, den α -Ketten; es wird also sowohl 7s- als auch 11s-IgA erfasst

Anti-Colostrum-IgA (MEDAC GmbH 10 MAT)

Dieses Antiserum besitzt Antikörper gegen die α -Ketten des IgA und zusätzlich solche gegen die sekretorische Komponente (SC). Anti-Colostrum-IgA reagiert also mit α -Ketten, intakten IgA-Molekülen, intakten 11s-IgA und freier SC.

Anti-Secretory-Piece (MEDAC GmbH 10 MSP):

Dieses Antiserum ist spezifisch für die sekretorische Komponente (SC) des 11s-IgA.

Man erreicht dadurch eine durch das sekretorische 11s-IgA und evtl. vorhandene freie SC bedingte Präzipitation. Da das Präparat aus dem Anti-Colostrum-IgA durch Absorption mit Serum-IgA hergestellt wird, sind die Antikörper gegen die verborgenen Determinanten (hidden determinants) der SC schwach oder nicht vorhanden. Unter den "hidden determinants" versteht man antigenetische Determinanten, die zwar beim freien SC vorhanden, beim gebundenen SC = 11s-IgA aber maskiert bzw. versteckt sind (7, 11, 66). In der Literatur wird häufig darauf verwiesen, daß Anti-SC-Antiseren oft auch Antikörper gegen Lactoferrin enthalten (92, 58, 37). Das in dieser Arbeit verwendete Antiserum wurde daraufhin mit der OUCHTERLONY-Technik überprüft. Dabei diffundierte Colostrum gegen Anti-SC und Anti-Lactoferrin (MEDAC). In beiden Fällen zeigte sich nur je eine Präzipitationslinie. Die beiden Linien zeigten untereinander das Muster einer vollständigen Nicht-Identität. Abb.6c) Dieser OUCHTERLONY-Test zeigt also, daß das Anti-SC-Antiserum keine Antikörper gegen Lactoferrin besitzt.

b. Standardpräparation (62) Abb. 11

Es wird der Versuch unternommen, aus Colostrum⁺ 11s-IgA zu isolieren. Die gesamte Präparation wird in einem Kühllabor bei 4°C vorgenommen.⁺⁺ 150 ml Colostrum werden durch Zentrifugation bei 4°C bei 10.000 UPM für 30 Minuten (SORVALL GSA-Rotor) entfettet. Pro 100 ml Überstand, dem Milchserum, werden 49,25 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (in der Hitze gelöst) zugesetzt.

Die Lösung wird mit Hilfe von 6 N NH₄OH auf einen pH von 7,0 gebracht.

Nach 16 Std. bei 4°C erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C mit 10.000 UPM für 30 Minuten. Pro 100 ml Überstand

+ Das Colostrum wurde uns dankenswerter Weise von der II. Universitäts-Frauenklinik überlassen.

++ Die Isolierung konnte dank der Hilfe von Herrn Dr. Hirsch im Institut für Physiologische Chemie der Universität München vorgenommen werden.

werden 10,65 g kristallisiertes Ammoniumsulfat zugegeben. Nach 16 Std. bei 4°C wird nun wieder eine Zentrifugation bei 4°C mit 10.000 UPM für 30 Minuten durchgeführt. Der Überstand wird verworfen, während das Präzipitat, das sich abgesetzt hat, in dest. Wasser gelöst wird. Diese Lösung wird nun 36 Stunden lang bei 4°C gegen dest. Wasser dialysiert (Dialysierschlauch: UNION CARBIDE CORP. Size 8 x 1500 FF; etwa 1 cm breit)

Hierauf wird die dialysierte Lösung mit Überdruck (Stickstoff) auf 10 ml konzentriert (AMICON: Membran PM 30). Als nächster Schritt folgt eine Gelfiltration mit Sephadex G - 200 (PHARMACIA). Als Vorbereitung zu dieser wird das Sephadex-Gel 3 Tage bei 4°C im Puffer gequollen, entgast und in eine Säule 100 x 2,5 cm gefüllt. Der Puffer, mit dem eluiert wird (0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; pH 8,0) enthält zur Verhinderung eines Bakterienwachstums 0,2% Natriumazid. Nach dem Auftragen der Probe, 5 ml der konzentrierten Lösung, werden mit einem Fraktionensammler Fraktionen zu je 2 ml $\hat{=}$ 30 Tropfen aufgefangen. Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen werden mit einem ZEISS-Spektralphotometer bei 280 nm gemessen.

Das Elutionsdiagramm (Abb.9) zeigt zwei deutlich getrennte Peaks. Die zum ersten Peak gehörigen Fraktionen werden zusammengesammelt, konzentriert und gegen dest. H₂O dialysiert (wie oben beschrieben).

Nun wird eine Gelfiltration mit Sepharose 6 B (PHARMACIA) durchgeführt. Mit den gequollenen, entgasten Gel wird eine Säule 50 x 2,5 cm gefüllt. Der Elutionspuffer enthält 0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 0,2% Natriumazid (pH = 8,0). Die Sepharose 6 B erlaubt eine Trennung der 17 s Moleküle (Peak I) von den 11s Molekülen (Peak II).

Nach dem Auftragen der Probe (5 ml der konzentrierten Fraktionen des ersten Peaks der G - 200 Trennung), werden wieder Fraktionen zu je 2 ml $\hat{=}$ 30 Tropfen gesammelt. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgt bei 280 nm.

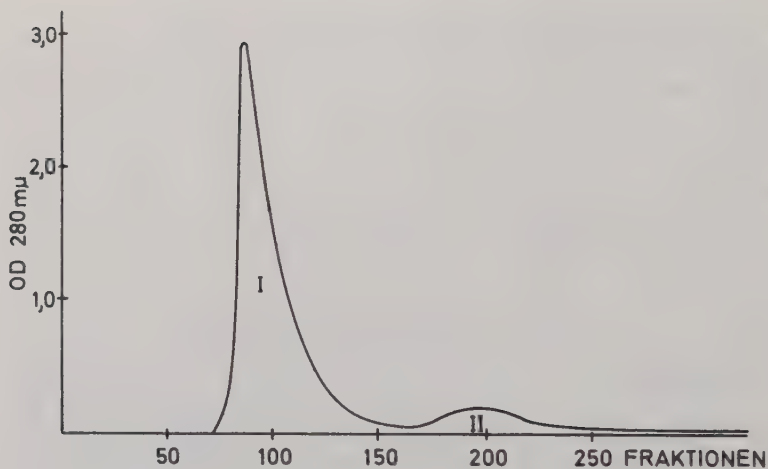


Abb. 9 Gelfiltration mit Sephadex G-200
Das Elutionsdiagramm zeigt 2 deutlich getrennte Peaks (I u. II); die zum ersten Peak gehörigen Fraktionen werden gesammelt und weiter verarbeitet.

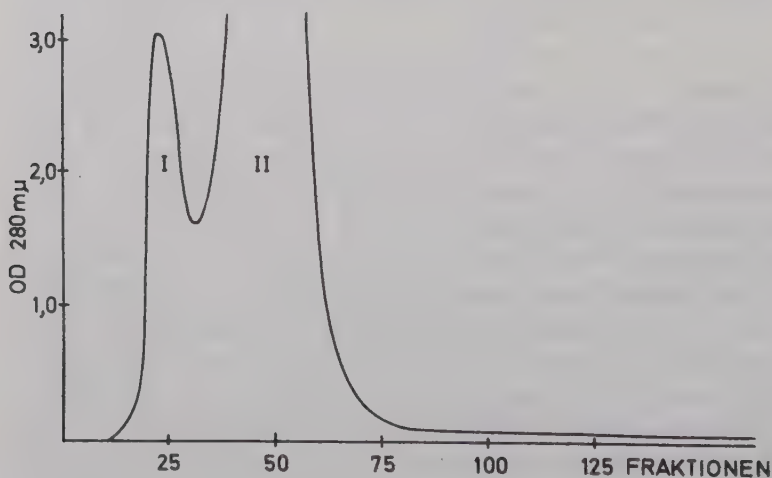


Abb. 10 Gelfiltration mit Sepharose 6 B
Das Elutionsdiagramm zeigt zwei deutlich getrennte Peaks (I. u. II); die zum zweiten Peak gehörigen Fraktionen werden gesammelt und auf ihre Reinheit, bezüglich des 11s-IgA, hin untersucht.

Das erhaltene Elutionsdiagramm (Abb. 10) zeigt wieder zwei Peaks. Die Fraktionen, die zum zweiten Peak gehören, werden zusammengeschüttet und auf ihre Reinheit, bezüglich des 11s-IgA, hin untersucht.

Reinheitsprüfung:

1. Immunelektrophoresen mit folgenden Antiseren

Anti-IgA α - Kette	BEHRING
Anti-Human-Serum	BEHRING
Anti-Human-Colostrum-Serum	BEHRING
Anti-Colostrum-IgA	MEDAC
Anti-Secretory-Piece	MEDAC

Mit allen fünf Antiseren ergibt sich im Immunelektrophorese-Bild je nur eine einzige gleichaussehende Linie, die in Form und Lage dem IgA entspricht.

2. Mit den oben erwähnten Antiseren wird auch eine Gel-diffusion nach OUCHTERLONY durchgeführt. Wieder ergibt sich pro Antiserum nur eine einzige Präzipitationsbande. Beim OUCHTERLONY mit Anti-Colostrum-IgA spornt die Präparation über das Serum-IgA. Mit einem Anti-Lactoferrin-Antiserum (MEDAC) ergibt sich keine Präzipitationslinie.

Auf Grund dieser Untersuchungen wird die Lösung, die man aus dem zweiten Peak der Sepharose 6 B - Auftrennung erhält, als genügend gereinigt betrachtet, um als Standard bei der quantitativen Bestimmung des sekretorischen 11s-IgA zu dienen.

Um quantitative Aussagen machen zu können, muß nun noch die Proteinkonzentration des Standards ermittelt werden. Dies geschieht mit der Methode nach FÜHR/HINZ. Der Eiweißgehalt des Standards beträgt 325 mg/100 ml.

Um zu sehen, inwieweit sich die Verwendung einer 11s-IgA-Standard an stelle eines Serum-7s-IgA-Standards (Standard-Human-Serum BEHRINGWERKE) quantitativ auswirkt, wird IgA in einer Probe mit der MANCINI-Technik (Anti-IgA) bestimmt. Zur Auswertung wird sowohl der 11s-Standard als auch der 7s-Standard verwendet.

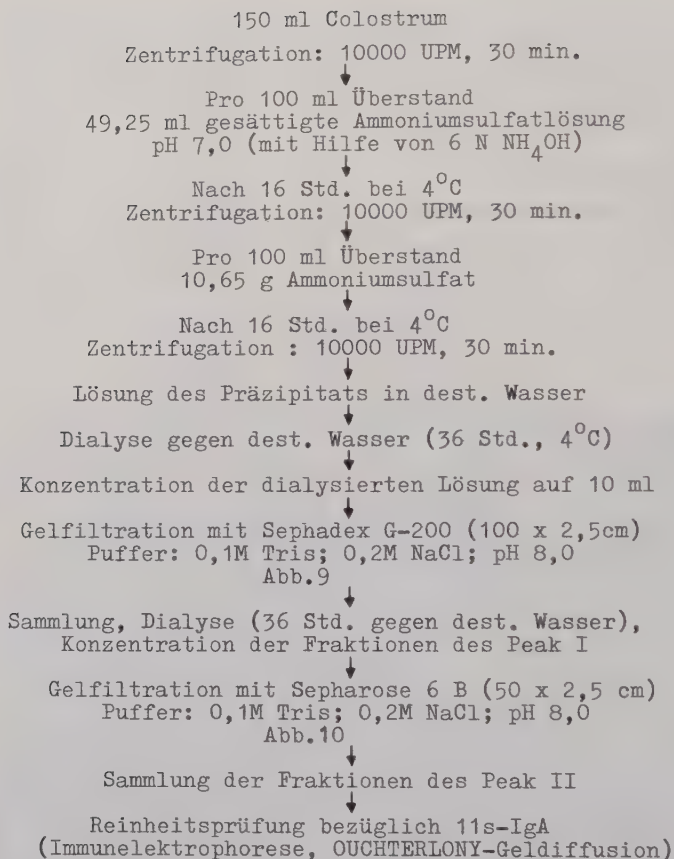


Abb. 11 Präparation des 11s-IgA-Standards aus Colostrum

Bei Verwendung des 11s-IgA-Standard liegen die Ergebnisse um das 2,17-fache höher als wenn der 7s-IgA-Standard zur Aufstellung der Eichkurve benutzt wird. Dieses Ergebnis stimmt in etwa mit dem in der Literatur angegebenen überein (5).

Zur Lagerung wird die 11s-IgA-Präparation in kleine Portionen (100 μ l) aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

Messung des 11s-IgA

Zur Bestimmung der 11s-IgA-Konzentration werden mit den, in der Kollodiumhülle konzentrierten, Tracheobronchialsekreten folgende Untersuchungen durchgeführt.

1. Einfache radiale Immundiffusion (RID) in Anti-IgA-haltigem Agar.

Hierzu werden die käuflichen S-Partigen-IgA-Platten (BEHRINGWERKE) verwendet, deren Meßbereich für 7s-IgA zwischen 3 und 35 mg/100 ml liegt.

Mit diesen Platten wird sowohl 7s- als auch 11s-IgA erfasst. Da physiologischerweise das 11s-IgA etwa 90% des Gesamt-IgA in Sekreten ausmacht, kann im Normalfall die 11s-IgA-Konzentration mit genügender Genauigkeit in diesen Platten gemessen werden. Als Standard werden 1:5, 1:10, 1:20-Verdünnungen der weiter oben beschriebenen 11s-IgA-Präparation benutzt.

2. Einfache radiale Immundiffusion (RID) in Anti-Secretory-Piece-haltigem Agar.

Unter pathologischen Umständen, bei Entzündungen der Schleimhäute mit dadurch bedingter Serumexsudation in die Sekrete, bei einem Defekt in der 11s-IgA-Bildung mit in ausreichender Menge vorhandenem Serum-7s-IgA, stellt das 11s-IgA nicht mehr 90% des Gesamt-IgA dar. Eine Messung mit Anti-IgA aus diesem Grunde ist nicht mehr anzuwenden.

Deshalb werden die Proben mit RID in Anti-Secretory-Piece-Gel bestimmt. Anti-Secretory-Piece reagiert zwar mit 11s-IgA, aber nicht mit 7s-IgA.

Die dazu nötigen Platten werden, wie schon beschrieben, selbst hergestellt. Hierzu wird das Antiserum zu 2% in flüssigem Agar gelöst. Der Meßbereich der Platten liegt dann zwischen 5 und 60 mg/100 ml (für 11s-IgA).

Zur Erstellung der Eichkurve werden 1:5, 1:10, 1:20 - Verdünnungen des 11s-Standards benutzt.

Der Nachteil der Messmethode ist aber, daß mit dem Anti-Secretory-Piece-Antiserum nicht nur das 11s-IgA, sondern auch evtl. vorhandene freie sekretorische Komponente (SC) erfasst wird.

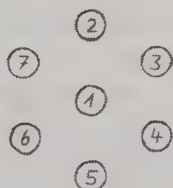
Nach SOUTH (83) kommt freie SC nur im Speichel von kleinen Kindern und bei Patienten mit einer Agammaglobulinämie vor, während in den Sekreten Erwachsener freie SC nicht nachweisbar ist.

BRANDTZAEG (12) hingegen hat freie SC in allen normalen Parotissekreten und Nasalflüssigkeiten, die untersucht wurden, dargestellt. Das Verhältnis freie SC / 11s-IgA aber ist mit 0,15 relativ klein. Trotzdem muß geklärt werden, ob eine untersuchte Probe freie SC enthält; dazu wird die Methode nach OUCHTERLONY benutzt.

3. Geldiffusion nach OUCHTERLONY

Diese Methode liefert keine quantitativen Ergebnisse, sondern zeigt nur qualitativ an, welche Komponenten des sekretorischen IgA-Systems in der Probe vorhanden sind.

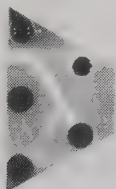
Es wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:



1. Anti-Colostrum-IgA
2. 11s-IgA-Standard
3. Probe
4. Sputum eines Patienten mit einer Agammaglobulinämie; das Sekret enthält kein IgA; SC ist nur in freier Form vorhanden.
5. leer
6. siehe 4.
7. Probe

Folgende Möglichkeiten können eintreten:

1.

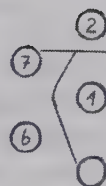
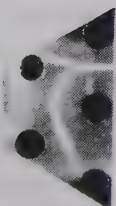


Präzipitationslinie der Probe (3):
vollständige antigenetische Identität mit 11s-IgA-Standard-Linie (2) (Abb.6a);
teilweise antigenetische Identität mit der freien SC-Linie (4) (Abb.6 e)
→ die Probe enthält nur 11s-IgA

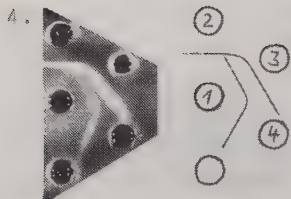
Präzipitationslinie der Probe (3):
teilweise antigenetische Identität mit dem 11s-IgA-Standard (2) (Abb.6 e);
antigenetische Nicht-Identität mit der freien SC-Linie (4) (Abb. 6 c)
→ die Probe enthält nur 7s-IgA
(diese Möglichkeit ist bei den durchgeführten Untersuchungen nicht vorgekommen)



2.



Präzipitationslinie der Probe (7):
teilweise antigenetische Identität mit der 11s-IgA-Linie (2) (Abb. 6 e);
antigenetische Identität mit der freien-SC-Präzipitation (6) (Abb. 6 a)
→ die Probe enthält nur freie SC



Präzipitationslinie der Probe (3):

die innere Linie zeigt teilweise antigenetische Identität mit der 11s-IgA Linie (2) und vollständige antigenetische Identität mit der freien-SC-Präzipitation (4) → die Probe enthält freie SC; die äußere Linie zeigt vollständige antigenetische Identität mit

der 11s-IgA-Standardlinie (2). Da die Anti-Secretory-Piece-Antikörper des Antiserums bereits mit der freien SC in der inneren Linie präzipitiert haben, stellt die äußere Linie die Präzipitation der Anti-IgA-Antikörper des Antiserums mit der Probe dar. Anhand der OUCHTERLONY-Geldiffusion kann nicht entschieden werden, ob die äußere Linie eine Präzipitation des 7s-IgA oder des 11s-IgA darstellt. Proben, die im OUCHTERLONY-Test eine derartige Konstellation ergeben, enthalten also entweder freie SC + 7s-IgA oder freie SC + 11s-IgA.

Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt für 7s-IgA bei etwa 5 mg/100 ml; 11s-IgA wird bei einer Konzentration zwischen 8 und 10 mg/100 ml sichtbar.

Schwierigkeiten für die selektive 11s-IgA ergeben sich nur bei der oben aufgeführten Möglichkeit 4. In diesem Fall ist neben der freien SC noch 7s- oder 11s-IgA nachweisbar. Eine selektive quantitative Messung des 11s-IgA ist also weder mit der Anti-IgA- noch mit der Anti-SC-Immendiffusionsplatte möglich.

In einem derartigen Fall wird mit der Probe eine zweidimensionale Immunelektrophorese durchgeführt.

4. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die Proben müssen vor jedem Lauf durch Carbamylierung so verändert werden, daß auch die γ -Globuline bei pH 8,6 zur Anode wandern. In der ersten Dimension dieser Elektrophorese werden das 11s-IgA und die freie sekretorische Komponente auf Grund ihrer verschiedenen Beweglichkeit im elektrischen Feld voneinander getrennt. Bei der, in der zweiten Dimension erfolgenden, Wanderung der aufgetrennten Proteine in das antikörperhaltige Gel entstehen zwei Immunpräzipitate (11s-IgA + freie SC),

wenn als Antiserum Anti-Secretory-Piece verwendet wird (Abb.12) Das Antiserum wird zu 5% in der flüssigen Agarose für die zweite Dimension gelöst, um 11s-IgA-Konzentrationen zwischen etwa 5 und 40 mg/100 ml messen zu können.

Versuche, in denen Proben aufgetrennt werden, die nur freie SC (Sputum eines Agammaglobulinämiepatienten) bzw. nur isoliertes 11s-IgA enthalten, zeigen, daß die näher an der Auftragsstelle liegende Präzipitationskurve AB^+ dem 11s-IgA zugehörig ist. Das weiter zur Anode liegende Präzipitat der freien SC (CD^+) schneidet unter den Versuchsbedingungen die Strecke AB^+ immer anodenwärts von deren Mittelpunkt M^+ .

Bei Proben, die sowohl 11s-IgA als auch freie SC enthalten, ergeben sich aus Gründen einer Überlagerung zwischen den Punkten C^+ und B^+ unvollständige Präzipitate. Der absteigende Schenkel der 11s-IgA-Kurve ist hier mangelhaft ausgebildet, während im aufsteigenden Kurventeil keine Interferenz zu erwarten ist. In diesen Fällen wird das 11s-IgA-Präzipitat auf folgende Weise zeichnerisch ergänzt:

Bei jedem Lauf wird ein Standard mit einer bekannten Menge an isoliertem 11s-IgA mit aufgetrennt. Da sich die 11s-IgA-Konzentration der Probe und des Standards in der gleichen Größenordnung bewegen, kann die Grundlinie der beiden Präzipitationen als gleich betrachtet werden. Vom Punkt Ap^+ des Probenpräzipitats wird auf der Grundlinie die halbe Breite der Standardpräzipitation $A_s B_s^+$ anodenwärts angetragen; in dem nun erhaltenen Punkt M^+ wird die Senkrechte zur Grundlinie bis zur Präzipitationskurve der Probe errichtet. Die Fläche zwischen den Punkten $A M E^+$ braucht jetzt nur noch symmetrisch bis zum Punkt B_p^+ ergänzt zu werden.

Zur quantitativen Auswertung wird die Fläche unter dem Probenpräzipitat mit der Fläche unter dem Standardpräzipitat verglichen. Die 11s-IgA-Konzentration kann mittels eines Dreisatzes aus der 11s-IgA-Konzentration des Standards, der Fläche des Standard- und des Proben-Peaks errechnet werden.

+ Die Buchstaben A B C D E M beziehen sich auf Abb. 12

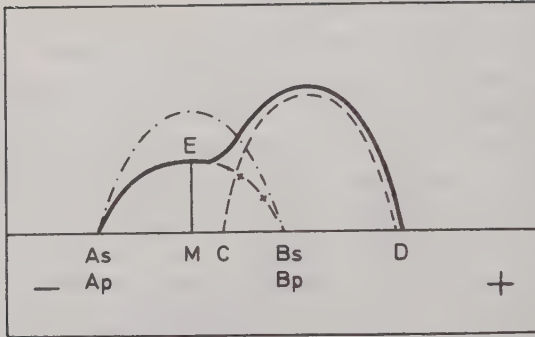


Abb. 12 Auftrennung von Tracheobronchialsekret mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Antiserum: Anti-secretory-Piece)

Oberer Teil

In der Zeichnung sind gleichzeitig folgende Präzipitationslinien eingezeichnet

- a. Probe mit isoliertem 11s-IgA (Standard)
- b. Sekret eines Patienten mit einer Agammaglobulinämie (nur freie SC, kein 11s-IgA)
- c. Sekret, das sowohl 11s-IgA als auch freie SC enthält
- +--+ Im Fall c ist die 11s-IgA-Präzipitation, wie im Text beschrieben, zeichnerisch bis zur Grundlinie ergänzt.

Unterer Teil

Auftrennung einer Sekretprobe, die sowohl 11s-IgA als auch freie SC enthält; die 11s-IgA-Präzipitation ist bereits zeichnerisch ergänzt.

Zusammenfassung der selektiven 11s-IgA-Messung

Von jeder Probe wird zunächst eine Geldiffusion nach OUCHTERLONY angefertigt. Nach dem Ergebnis dieser Untersuchung (S.49,50) richtet sich das weitere Vorgehen.

- a. OUCHTERLONY-Möglichkeit 1 (die Probe enthält nur 11s-IgA):
11s-IgA-Bestimmung mittels RID in Anti-Secretory-Piece-haltigem Agar mit 11s-IgA-Standard
- b. OUCHTERLONY-Möglichkeit 2 (die Probe enthält nur 7s-IgA):
7s-IgA-Bestimmung mittels RID in Anti-IgA-haltigem Agar mit 7s-IgA-Standard (BEHRING Standard-Human-Serum)
- c. OUCHTERLONY-Möglichkeit 3 (die Probe enthält nur freie SC):
Es wird keine quantitative Bestimmung durchgeführt
- d. OUCHTERLONY-Möglichkeit 4 (die Probe enthält entweder 7s-IgA + SC oder 11s-IgA + freie SC):

Zur Abklärung wird eine zweidimensionale Immunelektrophorese mit Anti-Secretory-Piece-Antiserum durchgeführt; diese zeigt

entweder I: sowohl eine 11s-IgA-Präzipitation als auch eine freie SC-Kurve; die 11s-IgA-Konzentration wird aus der Fläche unter dem 11s-IgA-Peak mittels eines mitgeführten Standards errechnet

oder II: nur eine freie SC-Präzipitation; dadurch wird bewiesen, daß das IgA dieser Probe dem 7s-IgA entspricht. Die 7s-IgA-Konzentration wird mittels RID in Anti-IgA-haltigem Gel und einem 7s-IgA-Standard gemessen.

Bei den Möglichkeiten a. und d. I wird zusätzlich IgA mit RID in Anti-IgA-haltigem Gel bestimmt (11s-IgA-Standard). Hier reagiert sowohl das 11s-IgA als auch evtl. vorhandenes 7s-IgA. Ist der mit dieser Methode erhaltene Wert wesentlich größer als die selektiv gemessene 11s-IgA-Konzentration (siehe oben), so spricht dies für das Vorhandensein einer beträchtlichen Menge an 7s-IgA.

Da es sich bei den untersuchten Proben nicht um reine Tracheobronchialsekrete, sondern um Spülflüssigkeiten derselben handelt, müssen die Konzentrationen der einzelnen Proteine in mg/100mg Gesamtprotein ausgedrückt werden.

Doch hieraus ergibt sich ein weiteres Problem. Bei Entzündungen mit einer Exsudation von Serumproteinen erniedrigt sich zwangsläufig der relative Anteil der sekretspezifischen Eiweiße (z.B. 11s-IgA) am Gesamtprotein, ohne daß diese Proteine absolut erniedrigt sind.

Deshalb ist es günstiger, die Konzentration des 11s-IgA nicht auf das Gesamtprotein, sondern auf ein anderes sekretspezifisches Eiweiß zu beziehen. Die Konzentration dieses Bezugsproteins sollte allerdings bei den zu untersuchenden Krankheiten nicht von der Norm abweichen.

In dieser Arbeit wird versucht, Lactoferrin als sekretspezifisches Bezugsprotein zu verwenden.

Die Konzentration des Lactoferrins im Sekret ist bei Erkrankungen des Respirationstraktes kaum verändert; bei akuten Infekten ist sie eventuell etwas erhöht (68,105), während sie bei chronischen Erkrankungen der Luftwege leicht vermindert zu sein scheint (58).

Die quantitative Bestimmung des Lactoferrins erfolgt mittels RID in Anti-Lactoferrin-haltigem Gel (Antiserum-Konzentration im Gel: 1%). Das Anti-Lactoferrin ist monospezifisch und wurde von der Fa. MEDAC zur Verfügung gestellt. Als Standard wird nicht isoliertes Lactoferrin, sondern Colostrum verwendet.

Das Colostrum wird vorher mit 0,1N HCl auf pH 4,6 gebracht, 2 Stunden bei 37°C und 12 Stunden bei 4°C stehen gelassen; hierauf wird 30 Minuten bei 3000 UPM zentrifugiert. Vor seiner Verwendung wird der Überstand 12 Stunden gegen dest. Wasser dialysiert (34).

Da kein isoliertes Lactoferrin als Standard verwendet wird, ist eine Messung in mg/100ml nicht möglich.

Stattdessen wird eine willkürliche Verdünnung des Colostrums als 100 E definiert und die Lactoferrin-Konzentration der Probe in E ausgedrückt.

Dies ist möglich, da das Lactoferrin nur als Bezugswert zur 11s-IgA-Bestimmung gemessen wird. Die 11s-IgA-Konzentration wird dann in mg/100 E Lactoferrin ausgedrückt. Eine derartige Mengenangabe ist nun unabhängig von Serum-exsudationen in das Sekret, ja sogar von artifiziellen Blutbeimengungen.

B. Diskussion

Aus der Literatur sind nur wenige Versuche bekannt, Sekret-IgA selektiv zu bestimmen.

BIENENSTOCK und Mitarbeiter (5) trennten im Urin das 11s-IgA durch -Sephadex-Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie vom 7s-IgA und freiem SC ab, bevor es quantitativ bestimmt wurde.

BULL et al. (16) erreichten eine Trennung von 11s- und 7s-IgA im Darmsekret durch Ultrazentrifugation.

HANSON et al. (38) bestimmten 11s-IgA im Urin mit der RID (Anti-IgA), nachdem es durch eine Dünnschicht-Gelfiltration vom 7s-IgA abgetrennt worden war.

BRANDTZAEG (10) beschrieb eine Methode zur Trennung von 11s-IgA und SC mittels Sephadex-Gelfiltration.

Alle diese Methoden haben den Nachteil, daß sie entweder zuviel Untersuchungsmaterial verbrauchen oder aber nur in speziell ausgerüsteten Forschungslaboratorien durchgeführt werden können.

In dieser Arbeit wird versucht, im klinischen Labor das 11s-IgA mit Methoden zu bestimmen, die routinemäßig angewandt werden können und die nur wenig Untersuchungsmaterial benötigen. Die beschriebene 11s-IgA-Isolierung aus dem Colostrum ist zwar aufwendig, aber immer noch relativ einfach im Vergleich zu anderen 11s-IgA-Gewinnungsmethoden.

Außerdem reicht das 11s-IgA, das bei einem einzigen Lauf gewonnen wird, für mehrere tausend Untersuchungen aus. Die einfache radiale Immundiffusion in Anti-IgA bzw. Anti-SC-haltigem Gel ist eine einfache, rasch durchzuführende Untersuchung. Lästig ist nur, daß die Anti-SC-Immundiffusionsplatten selbst hergestellt werden müssen. Auch dieses Verfahren läßt sich jedoch rationalisieren, indem mehrere Platten gleichzeitig gegossen werden; die nicht sofort benötigten können bei 4°C gelagert werden.

Auch die Geldiffusion nach OUCHTERLONY ist einfach auszuführen. Eine Fehlinterpretation könnte aber bei dieser Methode dadurch zustande kommen, daß bei entsprechend niedriger Konzentration der freien SC die Präzipitationslinie derselben in die 11s-IgA-Präzipitationslinie übergeht; diese Konstellation würde den Anschein erwecken, daß keine freie SC in der Probe vorhanden ist.

Da die freie SC wegen ihres geringen Molekulargewichts (60.000) viel schneller diffundiert als das 11s-IgA (MG 390.000), ist bei einem Zusammenfallen der Präzipitationslinien der beiden Proteine die Konzentration der freien SC relativ viel geringer als die des 11s-IgA.

Ein so möglicherweise entstehender Fehler kann vernachlässigt werden.

Die zweidimensionale Immunelektrophorese ist, im Gegensatz zu den vorher genannten Methoden, keine Routineuntersuchung. Die Deutlichkeit der Präzipitationskurven hängt von mehreren Faktoren ab: z.B. Güte des Antiserums;

- Antigen- oder Antikörperüberschuß;
- Änderung der Leitfähigkeit des Puffers;
- zu hohe Luftfeuchtigkeit;
- zu starke Temperaturdifferenz zwischen Gelplatte und Kammer-temperatur;
- ungenügende Kühlung;

Mehrmals waren die entstandenen Präzipitate diffus, verschwommen und schwer ablesbar; diese Läufe mußten wiederholt werden.

Die zweidimensionale Immunelektrophorese ist eine sensible, störanfällige Methode, zu deren Durchführung man viel Zeit benötigt.

Die Empfindlichkeit aller oben genannten Methoden beträgt etwa 5mg/100ml für IgA; dies ist für die durchgeführten Untersuchungen ausreichend.

Der Bezug der IgA-Konzentration auf das Gesamtprotein ist nur bei Sekreten ohne stärkere Serumtranssudation richtig. Bei starker Serumtranssudation in die Sekrete ist es besser, die IgA-Werte auf ein anderes sekretspezifisches Eiweiß zu beziehen.

Aus dem Grund wird in der vorliegenden Arbeit das 11s-IgA pro 100 E Lactoferrin bestimmt.

Die Lactoferrinkonzentration ändert sich bei pathologischen Prozessen nur wenig. Da sie bei akuten Entzündungen evtl. etwas erhöht ist (68, 105), würde das 11s-IgA in diesen Fällen zu niedrig gemessen werden. Anders bei chronischen Erkrankungen, bei denen das Lactoferrin leicht erniedrigt ist (58); hier würde das 11s-IgA zu hoch berechnet werden. Die Bestimmung des 11s-IgA bezogen auf Lactoferrin im Sekret ist unabhängig von irgendwelchen Serum- bzw. Blutbeimischungen.

Der Hauptvorteil der beschriebenen Methoden zur selektiven 11s-IgA-Bestimmung ist ihr geringer Materialverbrauch; dadurch werden die durchgeführten Untersuchungen erst ermöglicht. So sind z.B. für alle beschriebenen Untersuchungen, einschließlich Gesamtprotein- und Lactoferrinbestimmung, nur 100 μ l Probe nötig.

Die Experimente können auch, mit Ausnahme der zweidimensionalen Immunelektrophorese, in jedem Labor routinemäßig

durchgeführt werden; sie sagen über den Zustand der lokalen Immunabwehr wesentlich mehr aus als die bloße, bis jetzt übliche, IgA-Bestimmung mit Anti-IgA-haltigen Immundiffusionsplatten.

3. Reifung der lokalen Immunabwehr

A. Ergebnisse

Es wurden Tracheobronchialsekrete von Kindern untersucht, bei denen keine entzündlichen oder degenerativen Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut bekannt waren. In den, anlässlich der Bronchoskopie, verfassten Berichten war stets der Vermerk "unauffälliges Tracheobronchialsystem" zu lesen. Die klinischen Diagnosen lauteten überwiegend: Fremdkörperaspiration (ohne Begleitbronchitis)
inspiratorischer Stridor bei Tracheomalazie
Stridor unklarer Genese
Laryngomalazie

Zu den 22 Sekreten, die mittels einer Bronchoskopie gewonnen wurden, kamen noch 8 Sekrete von Kindern und 5 von Erwachsenen. Die zuletzt genannten 13 Proben stammten von intubierten Patienten, in deren Anamnese keine Erkrankung des Respirationstraktes bekannt war.

Die Patienten wurden in 6 Altersgruppen eingeteilt.

Gruppe I : 0 - 1 Jhr.	n = 12 (n = Anzahl der Patienten)
II : 1 - 2 Jhr.	n = 4
III : 2 - 6 Jhr.	n = 7
IV : 6 - 14 Jhr.	n = 7
V : über 14 Jhr.	n = 5

Mit dem Sekret wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Gesamtproteinbestimmung (FÜHR/HINZ)
2. OUCHTERLONY-Geldiffusion

3. Messung des 7s-bzw. 11s-IgA mit RID (Anti-IgA)
4. Messung des 11s-IgA mit RID (Anti-Secretory-Piece)
5. Messung des Lactoferrins
6. Messung des Albumins mit RID (Anti-Albumin); hierzu wurden die käuflichen M-Partigen-Albumin-Platten (BEHRINGWERKE) benützt.

Waren in einer Probe mit dem OUCHTERLONY-Test sowohl freie SC als auch IgA nachweisbar, so wurde zusätzlich eine zweidimensionale Immunelektrophorese durchgeführt.

Zu jedem Tracheobronchialsekret wurde auch das entsprechende Serum untersucht; in diesem wurde neben dem Albumin das IgA gemessen (M-Partigen-Albumin und Tri-Partigen-IgA-Platten der BEHRINGWERKE).

Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 u. Abb. 12 zusammengefasst.

Erläuterungen zu Tab. 3

Geschl.	= Geschlecht
m	= männlich
w	= weiblich
OUCHTERLONY	= Spalte, in der die Komponenten des IgA-Systems (11s-IgA, 7s-IgA, freie SC) aufgeführt werden, die durch die auf Seite 53 angegebenen Untersuchungen in der Probe nachgewiesen werden können
Anti-IgA	= RID in anti-IgA-haltigem Agar mit 7s- bzw. 11s-IgA-Standard
Anti-SP	= RID in anti-Secretory-Piece-haltigem Agar mit 11s-IgA-Standard
2-D-Ieph	= Bestimmung des 11s-IgA mit zweidimensionaler Immunelektrophorese
11s-IgA	= Spalte, in der von den vorher berechneten IgA-Konzentrationen (mit Anti-IgA, Anti-SP, 2-D-Ieph) der Wert wiederholt wird, der am genauesten der 11s-IgA-Konzentration entspricht
mg / 100 mg Prot.	= Milligramm bezogen auf 100 Milligramm Gesamtprotein

Tabelle 3

Nr.	Pat.	Alter	Geschl.	Ouchter- lony	Tracheobronchialsekret		
					IgA-Bestimmung(mg/100mg Prot.)		
					Anti-IgA		Anti-SP
					7s-Stand	11s-Stand	11s-Stand

Gruppe I

1	L.J.	15 Tg.	m	freie SC 7s-IgA	0,82	--	--
2	K.T.	19 Tg.	m	freie SC 7s-IgA	2,16	--	--
3	B.S.	3 Wo.	w	freie SC 7s-IgA	1,4	--	--
4	Z.M.	4 Wo.	w	freie SC 7s-IgA	1,0	--	--
5	B.H.	3 Mo.	m	11s-IgA	--	2,6	2,08
6	T.M.	4 Mo.	m	freie SC 7s-IgA	0,78	--	--
7	M.M.	5 Mo.	m	11s-IgA freie SC 7s-IgA	--	3,4	4,06
8	H.A.	6 Mo.	w	freie SC 7s-IgA	0,53	--	--
9	K.T.	7 Mo.	m	11s-IgA	--	3,25	3,37
10	S.C.	7 Mo.	m	11s-IgA freie SC 7s-IgA	--	3,0	2,59
11	C.N.	8 Mo.	w	11s-IgA	--	2,29	2,43
12	S.J.	9 Mo.	m	freie SC 7s-IgA	0,9	--	--

Gruppe II

13	S.J.	16 Mo.	m	11s-IgA	--	4,78	4,78
14	B.H.	19 Mo.	w	11s-IgA freie SC	--	5,07	4,46
15	L.N.	20 Mo.	m	11s-IgA freie SC	--	2,83	5,07
16	G.M.	21 Mo.	m	11s-IgA	--	5,08	5,3

Tabelle 3

Nr.	Tracheobronchialsekret					Serum	
	2-D-Ieph (11s-IgA) mg/100mg Prot.	11s-IgA mg/100mg Prot.	Lacto- ferrin E/100mg Prot.	11s-IgA/ Lactof. mg/100E	Albumin mg/100mg Prot.	Albumin mg/100ml	IgA mg/100ml

Gruppe I

1	--	--	5,2	--	14,9	4260	22
2	--	--	6,82	--	10,8	3950	16
3	--	--	5,0	--	8,04	4050	28
4	--	--	5,96	--	13,5	3700	30
5	--	2,08	6,04	34,5	9,38	4560	50
6	--	--	4,92	--	11,0	4700	48
7	1,55	1,55	5,94	26,0	6,76	4580	46
8	--	--	7,32	--	10,7	3950	44
9	--	3,37	7,95	42,2	6,02	3920	45
10	1,48	1,48	5,65	26,2	12,3	4250	70
11	--	2,43	5,42	44,9	7,3	3960	48
12	--	--	10,0	--	8,7	3760	46

Gruppe II

13	--	4,78	8,04	59,5	11,0	4100	70
14	--	4,46	10,8	41,3	12,5	3870	52
15	2,43	2,43	7,0	34,6	10,4	4160	84
16	--	5,3	9,32	56,8	7,63	4720	66

Tabelle 3

Nr.	Pat.	Alter	Geschl.	Ouchter- lony	Tracheobronchialsekret		
					IgA-Bestimmung(mg/100mg Prot.)		
					Anti-IgA		Anti-SP
					7s-Stand	11s-Stand	11s-Stand

Gruppe III

17	S.A.	25 Mo.	m	11s-IgA	--	4,11	4,29
18	K.M.	30 Mo.	w	11s-IgA	--	5,59	7,93
19	W.C.	31 Mo.	w	11s-IgA	--	8,17	8,3
20	Z.D.	34 Mo.	w	11s-IgA 7s-IgA	--	7,5	5,6
21	D.J.	3 Jhr.	m	11s-IgA	--	3,7	2,72
22	W.B.	5 Jhr.	w	11s-IgA 7s-IgA	--	10,29	7,72
23	B.A.	5 Jhr.	m	11s-IgA	--	6,58	5,19

Gruppe IV

24	H.P.	6 Jhr.	m	11s-IgA	--	5,43	6,0
25	H.M.	8 Jhr.	m	11s-IgA freie SC	--	6,02	8,86
26	B.S.	9 Jhr.	w	11s-IgA	--	4,85	3,78
27	K.W.	9 Jhr.	m	11s-IgA	--	8,17	7,2
28	W.B.	9 Jhr.	m	11s-IgA	--	6,55	5,75
29	L.M.	10 Jhr.	w	11s-IgA	--	12,85	10,24
30	H.R.	13 Jhr.	w	11s-IgA	--	5,43	4,9

Gruppe V

31	A.P.	23 Jhr.	w	11s-IgA	--	7,15	5,8
32	R.E.	24 Jhr.	w	11s-IgA	--	5,75	5,3
33	G.S.	27 Jhr.	m	11s-IgA	--	5,8	5,55
34	E.W.	53 Jhr.	w	11s-IgA 7s-IgA	--	8,4	5,4
35	E.S.	61 Jhr.	m	11s-IgA	--	7,35	6,6

Tabelle 3

Nr.	Tracheobronchialsekret					Serum	
	2-D-Ieph (11s-IgA) mg/100mg Prot.	11s-IgA mg/100mg Prot.	Lacto- ferrin E/100mg Prot.	11s-IgA/ Lactof. mg/100E	Albumin mg/100mg Prot.	Albumin mg/100ml	IgA mg/100ml

Gruppe III

17	--	4,29	8,34	51,4	5,83	--	--
18	4,83	4,83	7,86	61,4	9,24	4430	133
19	--	8,3	12,8	64,8	10,3	5480	60
20	--	5,6	9,18	61,0	13,2	5040	117
21	--	2,72	4,69	58,0	11,1	5680	114
22	--	7,72	12,1	64,0	8,04	5400	266
23	--	5,19	7,85	66,1	10,1	4520	130

Gruppe IV

24	--	6,0	7,43	81,0	18,3	3720	218
25	5,45	5,45	10,8	50,5	11,0	5400	82
26	--	3,78	8,1	46,7	8,5	3780	124
27	--	7,2	9,73	74,0	10,9	3620	130
28	--	5,75	5,1	113,0	6,7	3870	96
29	--	10,24	17,17	59,7	11,9	4720	234
30	--	4,9	9,15	53,5	9,32	4630	291

Gruppe V

31	--	5,8	8,5	68,2	13,6	4560	164
32	--	5,3	6,24	85,0	10,1	4850	212
33	--	5,55	11,1	50,0	13,8	4230	258
34	--	5,4	9,15	59,0	5,4	4160	198
35	--	6,6	10,5	62,9	9,45	3850	450

Um sich eine bessere Übersicht zu verschaffen, werden aus den verschiedenen Werten, die in Tabelle 3 aufgeführt sind, die Mittelwerte mit Standardabweichungen errechnet.

IgA-Bestimmung (mg/100mg Prot)	Anti-IgA		11s-IgA
	7s-IgA-Stand.	11s-IgA-Stand.	11s-IgA-Stand.
Gruppe I	n = 7 1,08 $\pm$ 0,54	n = 5 2,91 $\pm$ 0,46	n = 5 2,18 $\pm$ 0,76
Gruppe II		n = 4 4,44 $\pm$ 1,08	n = 4 4,24 $\pm$ 1,26
Gruppe III		n = 7 6,56 $\pm$ 2,33	n = 7 5,52 $\pm$ 1,94
Gruppe IV		n = 7 7,04 $\pm$ 2,78	n = 7 6,19 $\pm$ 2,07
Gruppe V		n = 5 6,89 $\pm$ 1,12	n = 5 5,73 $\pm$ 0,52

Als nächstes werden die 11s-IgA-Werte mit den IgA-Konzentrationen verglichen, die man mit der herkömmlichen radialen Immundiffusion erhält (Anti-IgA-haltiges Gel. 11s-IgA-Standard).

IgA (RID mit Anti-IgA + 11s-Standard)

11s-IgA (RID mit Anti-SP + 11s-Standard oder 2-D-Ieph)

Gruppe I	n = 5	1,48 $\pm$ 0,6
Gruppe II	n = 4	1,07 $\pm$ 0,08
Gruppe III	n = 7	1,20 $\pm$ 0,18
Gruppe IV	n = 7	1,14 $\pm$ 0,12
Gruppe V	n = 5	1,21 $\pm$ 0,22

Die selektiv gemessene 11s-IgA-Konzentration beträgt also abgesehen vom 1. Lebensjahr (67%), zwischen 82% und 93% des mit der herkömmlichen IgA-Immundiffusionsplatte gemessenen Wertes.

Die Lactoferrin-Konzentration wird in E/100 mg Gesamtprotein ausgedrückt.

Gruppe I	n = 12	6,35 $\pm$ 1,48
Gruppe II	n = 4	8,79 $\pm$ 1,64
Gruppe III	n = 7	8,97 $\pm$ 2,75
Gruppe IV+V	n = 12	9,31 $\pm$ 3,33

Da das Lactoferrin beim Neugeborenen schon in etwa gleicher Konzentration wie beim Erwachsenen vorhanden ist, wird der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung für alle Altersgruppen gemeinsam berechnet.

$$\bar{x} = 8,14 \pm 2,76 \quad n = 35$$

Die 11s-IgA-Werte (mg/100 mg Protein) können nun auf die Lactoferrin-Konzentrationen (E/100 mg Protein) bezogen werden. Der Quotient wird also in mg/100 E Lactoferrin gemessen.

Gruppe I	n = 12	14,5 $\pm$ 18,7
Gruppe II	n = 4	48,1 $\pm$ 12,0
Gruppe III	n = 7	61,0 $\pm$ 5,0
Gruppe IV	n = 7	68,3 $\pm$ 23,4
Gruppe V	n = 5	65,0 $\pm$ 13,0

in Abb. 13 werden die 11s-IgA-Konzentrationen (mg/100 E Lactoferrin) und die Komponenten des IgA-Systems gegen das Alter der Kinder aufgetragen.

Neben dem IgA und dem Lactoferrin wurde noch das Albumin bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet sich für alle Altersgruppen gemeinsam als

$$\bar{x} = 10,22 \pm 2,79 \quad n = 35$$

In den zu den Tracheobronchialsekreten gehörenden Seren wurde ebenfalls Albumin und IgA bestimmt.

Serum-IgA (mg/100 ml): Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen

Gruppe I	n = 12	41,1 $\pm$ 14,7
Gruppe II	n = 4	68,0 $\pm$ 13,2
Gruppe III	n = 6	136,7 $\pm$ 68,6
Gruppe IV	n = 7	167,9 $\pm$ 79,5
Gruppe V	n = 5	256,4 $\pm$ 113,4

In Abb.14 werden die Serum-IgA-Konzentrationen gegen das Alter der Patienten aufgetragen.

Aus den Albumin- und den IgA-Konzentrationen (gemessen mit Anti-IgA-Immudiffusionsplatten) kann nun sowohl im Serum als auch im Sekret der Quotient Albumin/IgA berechnet werden.

	<u>Tracheobronchialsekret</u>	<u>Serum</u>
Gruppe I		
a) Sekrete, die nur 7s-IgA enthalten	12,27 $\pm$ 5,76 n = 7	138,7 $\pm$ 60,9
b) Sekrete, die auch 11s-IgA enthalten	3,8 $\pm$ 2,61 n = 5	84,22 $\pm$ 14,57

Alle Sekrete der Gruppen II - V enthalten 11s-IgA; die Berechnung der IgA-Konzentrationen erfolgte deshalb mit dem 11s-IgA-Standard.

Gruppe II	2,49 $\pm$ 0,9	n = 4	65,13 $\pm$ 13,62
Gruppe III	1,67 $\pm$ 0,69	n = 6	45,44 $\pm$ 24,58
Gruppe IV	1,73 $\pm$ 0,83	n = 7	31,11 $\pm$ 17,58
Gruppe V	1,59 $\pm$ 0,66	n = 5	19,33 $\pm$ 7,28

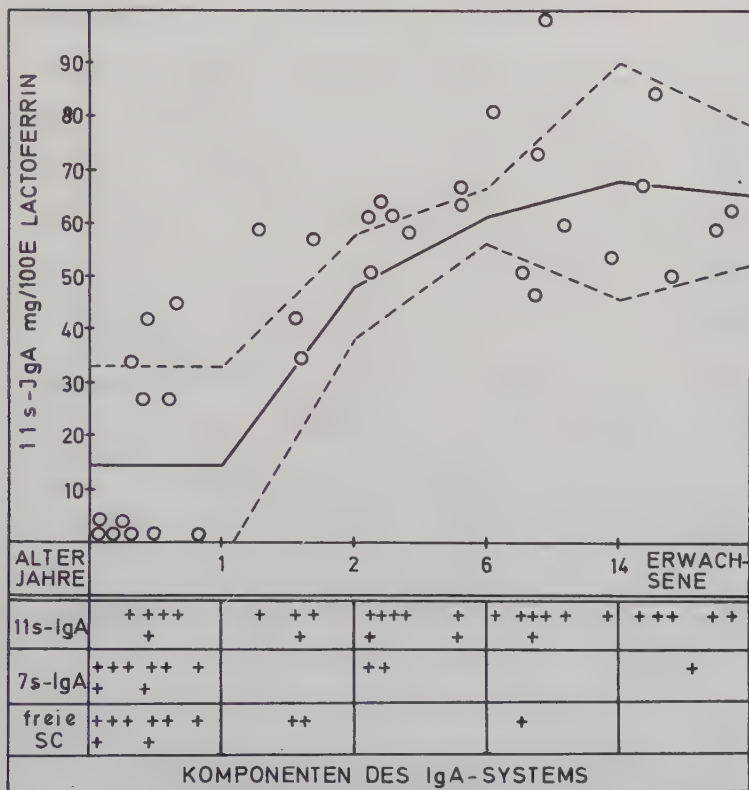


Abb. 13 Untersuchungen des IgA-Systems im Tracheobronchialsekret bei gesunden Kindern und Erwachsenen
Oberer Teil

Abszisse: Lebensalter in Jahren

Ordinate: ○ 11s-IgA-Konzentrat. (mg/100mg Lactof.)

— Mittelwert

----- Standardabweichung

Unterer Teil

Komponenten des IgA-Systems, die in den einzelnen Proben nachzuweisen sind.

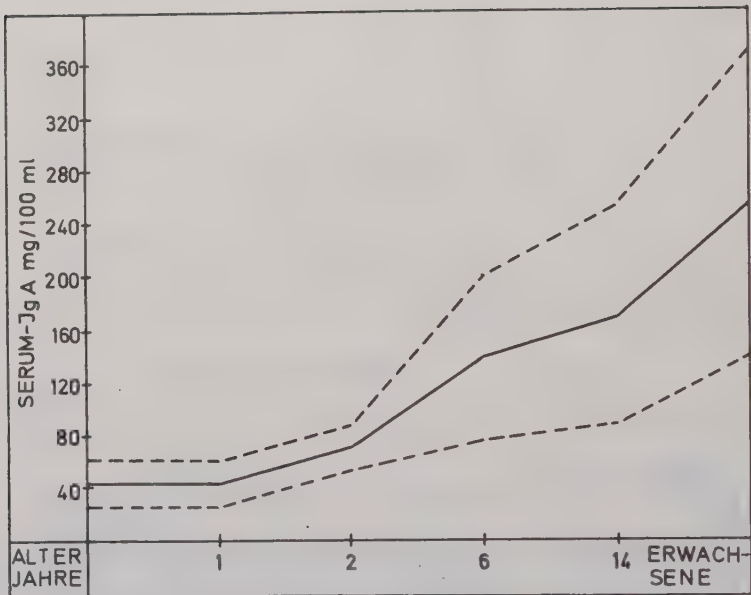


Abb. 14 IgA-Serumspiegel in Abhängigkeit vom Lebensalter bei gesunden Kindern und Erwachsenen
—— Mittelwerte, - - - - Standardabweichung

B. Diskussion

Während die Reifung der Serum-Immunglobuline im Kindesalter ein viel bearbeitetes Thema ist (1,87,97), ist relativ wenig über die Entwicklung der lokalen Immunabwehr bekannt. Beide Systeme, die humorale Immunabwehr im Serum und das lokale 11s-IgA-System, sind größtenteils voneinander unabhängig. Inwieweit die Plasmazellen der Schleimhäute, vor allem der Darmschleimhaut, für die Produktion eines Teils des im Blut kreisenden 7s-IgA verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt (95).

SELNER und Mitarbeiter (77), ebenso HAWORTH et al. (39) fanden, daß sekretorisches IgA im Speichel während der ersten Woche nach der Geburt nicht nachzuweisen ist. Doch dann kommt es zu einem schnellen Anstieg, sodaß bereits am 43. Tag 97% der Säuglinge Erwachsenenwerte bezüglich des Sekret-IgA aufweisen können. Die Serum-IgA-Konzentrationen betragen zu diesem Zeitpunkt nur 14% der Erwachsenenwerte.

SOUTH et al. (85) konnten bei der Geburt IgA weder im Serum noch im Speichel nachweisen. Bei den von ihnen untersuchten Kindern stieg die IgA-Konzentration in beiden Systemen allmählich an, bis zum Zeitpunkt der Pubertät Erwachsenenwerte erreicht waren. Freie sekretorische Komponente (SC) konnte mit dem OUCHTERLONY-Test nur im Speichel von Kindern (keine Altersangabe) festgestellt werden, während in den Proben Erwachsener diese Komponente nicht gefunden werden konnte (83). In den genannten Arbeiten wurde das Sekret-IgA mit einem anti-IgA-Antiserum gemessen; es wurde also nicht versucht, 7s-IgA und 11s-IgA getrennt zu untersuchen.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patienten konnte IgA sowohl im Serum als auch im Sekret nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit den vorher erwähnten Autoren wurde auch hier gefunden, daß das lokale IgA-System schneller heranreift als das Serum-IgA. Erwachsenenverhältnisse werden bei Kindern schon im 2. Lebensjahr erreicht; dies geht aus Abb.13 hervor. Beim Serum-IgA dauert diese Entwicklung bis über die Pubertät hinaus (Abb.14).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen IgA-Konzentrationen im Tracheobronchialsekret bei den 6 - 14 Jährigen ($7,04 \pm 2,78$ mg/100 mg Gesamtprotein) stimmen sehr gut mit den IgA-Konzentrationen in nasalen Spülflüssigkeiten ($9,53 \pm 4,34$ mg/100 mg Gesamtprotein) überein, die HOBDAÏ et al. (41) bei 6 - 14 jährigen normalen Kindern ermittelt haben. Sekretorische Komponente (SC), gebunden oder frei, war in jeder untersuchten Probe nachzuweisen. Auffällig ist dabei, daß, von einer Ausnahme abgesehen, nur im ersten und zweiten Lebensjahr freie SC mit dem OUCHTERLONY-Test nachweisbar war; bei der Ausnahme handelte es sich um einen 8-jährigen Jungen, der neben einer normalen 11s-IgA-Konzentration eine geringe Menge freie SC in seinem Sekret hatte.

Bei Patienten mit ausgereiftem lokalen Immunsystem, d.h. bei gesunden Kindern, älter als 2 Jahre, und bei Erwachsenen, war keine freie sekretorische Komponente aufzufinden. Daraus kann man schließen, daß freie SC nur in den Fällen im Sekret vorhanden ist, in denen die Plasmazellen der Schleimhaut, im Vergleich zur produzierten SC-Menge, zu wenig IgA bilden. SC wird unabhängig vom Lebensalter von den Epithelzellen erzeugt, die entlang des Respirationstraktes zu finden sind.

Weiterhin fällt auf, daß bei einigen Kindern im ersten Lebensjahr zwar 7s-IgA und freie SC, aber kein oder nur wenig 11s-IgA vorhanden war. Diese Tatsache könnte evtl. durch eine Unreife in der enzymatischen Kopplung zwischen dem IgA-Molekül und der sekretorischen Komponente erklärt werden.

Aus dem soeben Genannten können folgende Zustände, die physiologisch auftreten, zusammengefasst werden:

1. Kinder im ersten und zweiten Lebensjahr

- a) die noch unreifen Plasmazellen produzieren im Vergleich zur altersunabhängigen SC zu wenig IgA $\rightarrow$ 11s-IgA erniedrigt (im Vergleich zu Erwachsenenwerten), freie SC ist vorhanden
- b) die enzymatische Kopplung zwischen IgA und SC ist noch unreif $\rightarrow$ 11s-IgA ist erniedrigt, 7s-IgA und freie SC sind nachweisbar

2. Kinder älter als zwei Jahre und Erwachsene

- a) die Plasmazellen produzieren im Vergleich zur SC ausreichend IgA → 11s-IgA ist im Bereich der Erwachsenen-normalwerte, freie SC und 7s-IgA sind mit dem OUCHTER-LONY-Test nicht nachweisbar
- b) sehr selten kann es evtl. zu einer Überproduktion von SC bei normaler, ausreichender IgA-Produktion kommen (Patient Nr.25) → 11s-IgA ist im Bereich der Erwachsenenwerte, freie SC ist vorhanden.

Inwieweit eine derartige "Überproduktion" schon pathologisch ist, kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Unter anderem wurde in dieser Arbeit neben dem IgA auch das Albumin im Tracheobronchialsekret und das IgA und Albumin im Serum bestimmt. In beiden biologischen Flüssigkeiten wurde daraus der Quotient Albumin/IgA berechnet.

Beim Vergleich der beiden Quotienten zeigt sich, daß der IgA-Spiegel im Sekret, bezogen auf das Albumin, etwa 10 - 30 mal höher ist als im Serum. Dies beweist, daß IgA im Vergleich zum Albumin, daß in der Leber produziert wird und nur durch passive Diffusion ins Sekret gelangt, (46) nicht durch eine Serumtranssudation im Sekret erscheint, sondern lokal produziert oder selektiv vom Serum ins Sekret transportiert wird.

Welche Rolle der SC bei dem, evtl. vorhandenen, selektiven Transport des IgA ins Sekret zukommt, ist noch nicht geklärt. Daß die sekretorische Komponente nicht allein dafür verantwortlich ist, wie früher angenommen wurde, zeigt sich in der Tatsache, daß schon bei Säuglingen, bei denen noch kein 11s-IgA nachweisbar ist, die IgA-Konzentration im Sekret (bezogen auf Albumin) etwa 10 mal höher ist als die im Serum.

4. Vergleich der 11s-IgA-Konzentration im Tracheobronchialsekret bei gesunden und kranken Kindern

Als Normwerte gesunder Kinder wurden die im Abschnitt 3 ermittelten Konzentrationen verwendet.

Die 40 pathologischen Sekrete stammen von 32 Kindern, an denen eine Bronchoskopie vorgenommen wurde.

Auf Grund der klinischen Diagnose und des Bronchoskopie-Berichtes wurde folgende Unterteilung vorgenommen:

- a) Patienten mit akuten, noch nicht rezidivierenden Entzündungen der Atemwege
- b) Patienten mit chronisch-rezidivierenden entzündlichen oder degenerativen Veränderungen des Respirationstraktes.

Die klinischen Diagnosen und Auszüge aus den Bronchoskopie-Berichten können aus der folgenden Zusammenstellung entnommen werden.

Neben der Unterteilung in akute und chronische Erkrankungen wurde die, in Abschnitt 3 beschriebene Gruppierung nach dem Lebensalter beibehalten.

Klinische Diagnosen und Auszüge aus den Bronchoskopie-Berichten Gruppe I: 0 - 1 Jhr. akute Entzündungen

Pat. Nr.	<u>klinische Diagnose</u>	<u>Bronchoskopie-Bericht</u>
1	Ateminsuffizienz	eitrige Bronchitis
2	Oesophagusatresie Tracheoösophagealfistel	mäßige Entzündung der Trachea
3	Z.n.Dauerintubation	geringgradige Tracheo-Bronchitis
4	starke Verschleimung, Atemstillstand Z.n.Dauerintubation	entzündliche Schleimhaut-hypertrophie des Larynx u. der oberen Trachea
5	Atemnot, Bronchitis	eitrige Tracheobronchitis
6	siehe 5, jedoch mit artifizieller Blutbeimengung	
7	Oesophagusatresie Tracheoösophagealfistel Kontrolle zu Pat.Nr.2	unauffälliges Tracheo-bronchialsystem

<u>Pat.Nr.</u>	<u>klinische Diagnose</u>	<u>Bronchoskopie-Bericht</u>
8	Pneumonie	verdickte Schleimhaut Tracheobronchitis
9	starke Atemwegsinfektion, Pneumonie	eitrige Tracheobronchitis
10	siehe Pat.Nr.9, jedoch Blutbeimischung	Sekret mit artifizieller
11	Minderbelüftung der linken Lunge, starke Bronchitis	linker Stammbronchus mit Schleim und Eiter gefüllt
12	Erdnußaspiration	schwere eitrig-membranöse Begleittracheobronchitis

Gruppe II: 1 - 2 Jhr.

a) akute Erkrankungen

13	Erdnußaspiration	eitrige poststenotische Begleitbronchitis
14	inspiratorischer Stridor	membranös eitrige Tracheitis; Larynxobstruktion durch eine Borke
15	Aspiration eines Knochensplitters, Bronchitis, Atelektase	eitrige Bronchitis

b) chronisch rezidivierende Erkrankungen

16	chronische Bronchitis	eitrige Bronchitis
17	Kontrollbronchoskopie zu Pat.Nr.16	

Gruppe III: 2 - 6 Jhr.

a) akute Erkrankungen

18	Erdnußaspiration	circumscripte eitrige Bronchitis
19	Aspiration eines Mandelstückes	eitrige Begleitbronchitis

b) chronisch-rezidivierende Erkrankungen

20	Pleuropneumonie; seit dem Säuglingsalter Anfälligkeit für Infekte, häufige Bronchitiden	Atelektase, sonst unauffälliges Tracheobronchialsystem
----	---	--

<u>Pat.Nr.</u>	<u>klinische Diagnose</u>	<u>Bronchoskopie-Bericht</u>
21	rezidivierende Bronchitiden und Pneumonien, Bronchiektasen, Herzinsuff.	entzündliche Rötung der Schleimhaut, eitrig Bronchitis
22	Bronchopneumonie (chron.) Z.n.Langzeitintubation	schwere Tracheobronchitis
23	Mukoviszidose Bronchopneumonie	Trachealschleimhaut entzündlich u. atrophisch verändert, zähes eitriges Sekret
24	Mukoviszidose Bronchiektasen	Schleimhaut des Tracheobronchialsystems erheblich entzündlich gerötet, kein obstruierendes Sekret
25	chronische Bronchopneumonie, IgA-Mangel, sek. Dystrophie	Trachea und beide Bronchialsysteme mit grünlich-weißem Eiter gefüllt, Schleimhaut hochgradig entzündlich verändert, Bronchiektasen
Gruppe IV: 6 - 14 Jhr.		
a) akute Entzündungen		
26	6 Wo.alter Fremdkörper im re.Zwischenbronchus	geringgradige Begleitbronchitis
27	Bronchitis, Pneumonie nach Fremdkörperaspiration	eitrig Bronchitis
b) chronisch rezidivierende Erkrankungen		
28	chronische Sinubronchitis, Bronchiektasen, Verdacht auf Kartagener-Syndrom	Bronchoskopiebericht fehlt
29	Mukoviszidose	schwere eitrig Tracheobronchitis
30	Mukoviszidose, Bronchopneumonie Kontrolle zu Pat.Nr.29	Trachea ist überflutet von eitrigem Sekret
31	Sinubronchitisches Syndrom, unklare Atelektase	mässige Tracheobronchitis, unauffälliges Tracheobronchialsystem
32	chronische Sinubronchitis Pneumonie, Atelektase des re. Mittellappens	Eiteransammlung im re.Mittellappen

<u>Pat.Nr.</u>	<u>klinische Diagnose</u>	<u>Bronchoskopie-Bericht</u>
33	Kontrolle zu Pat.Nr.32	eitrige Bronchitis, rechts stark entzündete Schleimhaut
34	Pneumektomie links, rezid.Bronchiektasen	Eiteransammlung in der Trachea und im re.Hauptbronchus
35	Kontrolle zu Pat.Nr.34	eitrige Bronchitis rechts
36	Bronchitis, Kartagener-Syndrom	eitrige Tracheobronchitis entzündete u.geschwollene Schleimhaut
37	Kontrolle zu Pat.Nr.36	eitriges Sekret in Trachea und Bronchien
38	rezidivierende Asthmoide Bronchitiden,Atelektrase	eitrige Tracheobronchitis deutlich gerötete Schleimhaut
39	rezidivierende Pneumonien, chron.Sinubronchitis,Bronchiektasen	eitrige Bronchitis rechts, Bronchiektasen im rechten Mittel- u. Unterlappen
40	Mukoviszidose,pulmonale Verschlechterung, Emphysem	Schleimhaut der Trachea hochgradig entzündlich und atrophisch verändert, schwere eitrige Tracheobronchitis

Mit den 40 Sekreten und den entsprechenden Seren wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt, die schon in Abschnitt 3 beschrieben sind.

A. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in Tab.4 u. Abb.15 zusammengefasst.

Erläuterungen zu Tab.4 siehe Abschnitt 3 (S.59)

Zur besseren Übersicht wird in Tabelle 4 bei den Patienten mit akuten Entzündungen des Respirationstraktes der Buchstabe A, bei Patienten mit chronisch-rezidivierenden Erkrankungen der Buchstabe C vor die jeweilige Pat.Nr. gesetzt.

Tabelle 4

Nr.	Pat.	Alter	Geschl.	Ouchterlony	Tracheobronchialsekret		
					IgA-Bestimmung(mg/100mg Prot.)		
					Anti-IgA		Anti-SP
					7s-Stand	11s-Stand	11s-Stand

Gruppe I

A1	M.H.	19Tg.	m	freie SC 7s-IgA	3,02	--	--
A2	E.D.	4Wo.	m	freie SC 7s-IgA	9,08	--	--
A3	S.I.	5Wo.	w	freie SC 7s-IgA	1,96	--	--
A4	M.N.	8Wo.	m	freie SC 7s-IgA	1,25	--	--
A5	F.B.	8Wo.	m	11s-IgA	--	4,28	4,4
A6	F.B.	8Wo.	m	11s-IgA 7s-IgA	--	0,91	0,66
A7	E.D.	3Mo.	m	freie SC 7s-IgA	2,58	--	--
A8	D.M.	4Mo.	m	freie SC 7s-IgA	5,65	--	--
A9	S.H.	5Mo.	m	11s-IgA	--	4,84	3,2
A10	S.H.	5Mo.	m	11s-IgA 7s-IgA	--	2,63	0,7
A11	W.C.	6Mo.	m	freie SC 7s-IgA	3,16	--	--
A12	U.S.	7Mo.	m	freie SC 7s-IgA	5,01	--	--

Gruppe II

A13	D.H.	16Mo.	w	11s-IgA 7s-IgA	--	9,83	5,45
A14	S.T.	16Mo.	m	freie SC 11s-IgA 7s-IgA	--	9,6	3,87
A15	Z.M.	16Mo.	w	11s-IgA	--	13,1	10,6
C16	N.R.	15Mo.	m	freie SC 11s-IgA 7s-IgA	--	11,8	6,91
C17	N.R.	16Mo.	m	freie SC 11s-IgA 7s-IgA	--	4,03	2,27

Gruppe III

A18	R.G.	2Jhr.	w	11s-IgA 7s-IgA	--	16,3	11,1
A19	S.A.	3Jhr.	m	11s-IgA	--	14,5	11,8
C20	L.M.	3Jhr.	w	11s-IgA	--	6,86	5,84

Tabelle 4

Nr.	Tracheobronchialsekret					Serum	
	2-D-Ieph (11s-IgA) mg/100mg Prot.	11s-IgA mg/100mg Prot.	Lacto- ferrin E/100mg Prot.	11s-IgA Lactof. mg/100E	Albumin mg/100mg Prot.	Albumin mg/100ml	IgA mg/100ml

Gruppe I

A1	--	--	5,82	--	20,6	3460	5
A2	--	--	7,63	--	16,1	4420	108
A3	--	--	3,93	--	17,1	4720	58
A4	--	--	4,9	--	30,5	4720	8
A5	--	4,4	9,0	48,9	19,9	3680	30
A6	--	0,66	1,32	50,0	44,5	3680	30
A7	--	--	10,1	--	11,2	4420	120
A8	--	--	4,28	--	22,7	5260	70
A9	--	3,2	6,1	52,5	10,2	4600	48
A10	--	0,7	1,35	51,8	52,0	4600	48
A11	--	--	10,0	--	18,9	3580	120
A12	--	--	4,65	--	19,9	4320	34

Gruppe II

A13	--	5,45	6,1	89,3	23,5	4140	48
A14	2,18	2,18	8,31	26,2	20,5	3460	96
A15	--	10,6	7,12	148,9	28,5	3960	40
C16	2,98	2,98	9,36	31,8	22,3	4520	234
C17	1,56	1,56	9,74	16,0	18,2	4220	190

Gruppe III

A18	--	11,1	4,63	239,5	23,1	5920	196
A19	--	11,8	5,72	206,3	20,2	--	--
C20	--	5,84	8,52	68,5	14,2	5940	190

Tabelle 4

Nr.	Pat.	Alter	Geschl.	Ouchterlony	Tracheobronchialsekret		
					IgA-Bestimmung(mg/100mg Prot.)		
					Anti-IgA		Anti-SP
					7s-Stand	11s-Stand	11s-Stand
C21	M.M.	3Jhr.	m	freie SC	1,18	--	--
				7s-IgA			
C22	R.E.	3Jhr.	w	11s-IgA	--	3,64	1,05
				7s-IgA			
C23	S.C.	3Jhr.	m	11s-IgA	--	2,83	0,78
				7s-IgA			
C24	P.E.	5Jhr.	w	11s-IgA	--	24,3	8,25
				7s-IgA			
C25	B.O.	6Jhr.	m	freie SC	0,51	--	--
				7s-IgA			
Gruppe IV							
A26	L.B.	7Jhr.	m	11s-IgA	--	10,2	9,53
A27	N.R.	11Jhr.	w	11s-IgA	--	19,1	15,9
				7s-IgA			
C28	S.A.	7Jhr.	w	11s-IgA	--	21,4	16,8
				7s-IgA			
C29	H.A.	7Jhr.	w	freie SC	--	3,44	5,23
				11s-IgA			
				7s-IgA			
C30	H.A.	7Jhr.	w	freie SC	--	3,3	4,06
				11s-IgA			
				7s-IgA			
C31	M.R.	7Jhr.	w	11s-IgA	--	5,8	7,16
C32	E.B.	8Jhr.	w	freie SC	0,88	--	--
				7s-IgA			
C33	E.B.	8Jhr.	w	freie SC	0,91	--	--
				7s-IgA			
C34	S.E.	8Jhr.	m	11s-IgA	--	8,25	3,36
				7s-IgA			
C35	S.E.	8Jhr.	m	11s-IgA	--	8,43	3,59
				7s-IgA			
C36	F.A.	8Jhr.	w	11s-IgA	--	16,8	15,5
C37	F.A.	8Jhr.	w	11s-IgA	--	13,3	11,8
C38	F.M.	8Jhr.	w	freie SC	--	2,04	3,68
				11s-IgA			
C39	B.M.	9Jhr.	w	freie SC	--	3,8	6,36
				11s-IgA			
				7s-IgA			
C40	J.E.	14Jhr.	m	11s-IgA	--	9,0	1,67
				7s-IgA			

Tabelle 4

Nr.	Tracheobronchialsekret					Serum	
	2-D-Ieph (11s-IgA) mg/100mg Prot.	11s-IgA mg/100mg Prot.	Lacto- ferrin E/100mg Prot.	11s-IgA/ Lactof. mg/100E	Albumin mg/100mg Prot.	Albumin mg/100ml	IgA mg/100ml
G21 --	--	--	6,8	--	21,9	5960	266
G22 --	--	1,05	5,25	20,0	17,3	6040	126
G23 --	--	0,78	4,45	17,5	28,0	4100	125
G24 --	--	8,25	7,7	107,0	29,7	4610	189
G25 --	--	--	4,21	--	25,6	5210	420
Gruppe IV							
A26 --	--	9,53	6,2	153,7	18,0	5300	212
A27 --	--	15,9	6,46	246,1	20,4	5600	230
G28 --	--	16,8	14,0	120,0	19,9	3450	230
G29 1,53	1,53	1,53	7,67	19,9	30,1	3650	158
G30 1,19	1,19	1,19	6,1	19,5	35,2	3250	158
G31 --	--	7,16	10,9	65,7	6,7	3840	82
G32 --	--	--	5,85	--	25,0	5868	139
G33 --	--	--	4,05	--	23,0	5110	145
G34 --	--	3,36	4,0	84,0	31,3	5120	212
G35 --	--	3,59	4,14	86,7	24,9	4900	210
G36 --	--	15,5	12,0	129,1	20,0	5600	390
G37 --	--	11,8	8,43	140,0	21,6	5450	410
G38 1,75	1,75	1,75	5,39	32,5	28,0	5000	218
G39 1,93	1,93	1,93	7,8	24,7	18,8	4600	228
G40 --	--	1,67	5,25	31,8	34,8	5600	476

Auswertung der Ergebnisse

Die eingeteilten Gruppen stellen ein heterogenes Krankengut dar, das nicht nur Krankheiten verschiedener Genese, sondern auch verschiedene Stadien einer bestimmten Erkrankung enthält. Deshalb wurde darauf verzichtet, die erhaltenen Ergebnisse (mit Ausnahme des Lactoferrins) statistisch auszuwerten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des OUCHTERLONY-Tests fällt auf, daß freie SC auch bei drei- bis neunjährigen Kindern zu finden ist, während normalerweise diese Komponente in ungebundener Form nur bis zum 2. Lebensjahr nachgewiesen werden kann.

Schwierig zu beurteilen sind die Lactoferrin-Konzentrationen. Mit einem Mittelwert von $6,63 \pm 2,68$ E /100 mg Gesamtprotein liegen die Werte etwas tiefer als bei den gesunden Vergleichspersonen ($8,14 \pm 2,76$ E /100 mg Gesamtprotein). Diese Verminderung ist aber wohl auf eine, bei den meisten Proben zu beobachtende, vermehrte Exsudation von Serumproteinen ins Sekret zurückzuführen. Die Lactoferrin-Konzentrationen zeigen also bei den hier untersuchten pathologischen Zuständen, im Vergleich zu den Normalwerten, keine entscheidenden Veränderungen.

Bei entzündlichen oder degenerativen Veränderungen der Schleimhaut des Tracheobronchialsystems, unter denen der größte Teil der hier untersuchten Patienten litt, kommt es zu einer vermehrten Exsudation von Serumproteinen in das Sekret. Ein Indikator für das Ausmaß des Serumeinstroms ins Sekret und somit für den Grad der Schleimhautschädigung ist die Albumin-Konzentration im Sekret. Während sie im Normalfall $10,22 \pm 2,79$ mg/100 mg Gesamtprotein beträgt, werden in Proben kranker Kinder bis über 30% des Gesamtproteins von Albumin gebildet.

Große Unterschiede bestehen zwischen den 11s-IgA/Lactoferrin-Werten der verschiedenen untersuchten Sekrete. Hier sind im Vergleich zum physiologischen Normbereich sowohl Erhöhungen als Verminderungen zu finden.

In Abb. 15 werden die 11s-IgA-Konzentrationen (mg/100 E Lactoferrin) und die Komponenten des IgA-Systems gegen

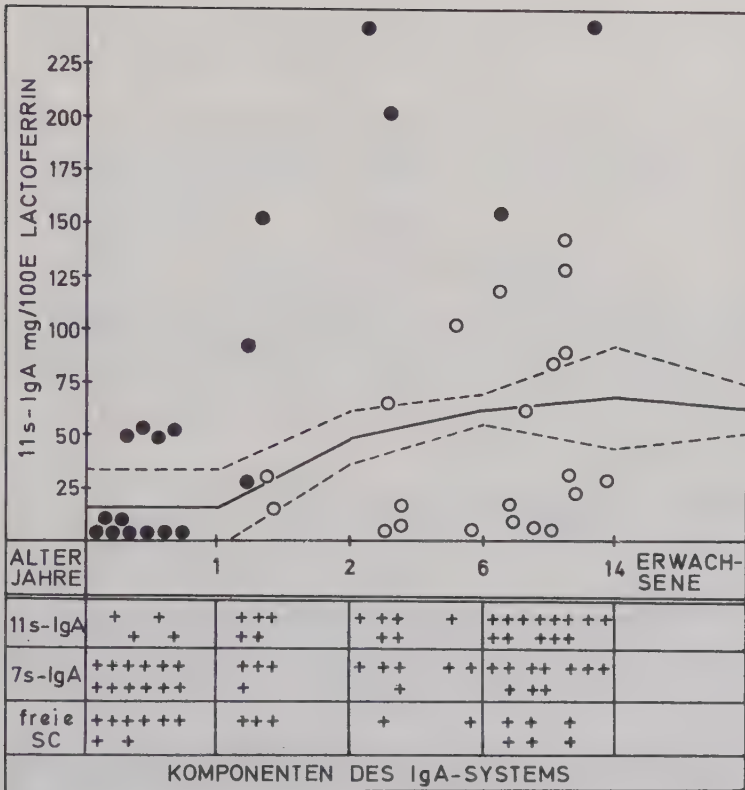


Abb. 15 Untersuchungen des IgA-Systems im Tracheobronchialsekret bei Kindern mit pathologischen Veränderungen des Respirationstraktes
Oberer Teil

Abszisse: Lebensalter in Jahren

Ordinate: 11s-IgA-Konzentrat. (mg/100mg Lactof.)

- Patienten mit akuten entzündlichen Veränderungen des Respirationstraktes
 - Patienten mit chronischen degenerativen Veränderungen des Tracheobronchialsystems
 - Mittelwert von Gesunden
 - - - Standardabweichung von Gesunden
- (Abb. 13)

Unterer Teil

Komponenten des IgA-Systems, die in den einzelnen Proben nachzuweisen sind

das Alter der Patienten aufgetragen.

Daß die 11s-IgA-Konzentrationen, bezogen auf 100 E Lactoferrin, unabhängig von Serumexsudationen, ja sogar von artifiziellen Blutbeimengungen sind, kann sehr gut an den Proben mit den Pat.Nr. A5 und A6 bzw. A9 und A10 beobachtet werden. Probe A5 hat 4,4mg/100 mg Prot. 11s-IgA, Probe A6 nach artifizieller Blutbeimengung nur 0,66mg/100 mg Prot. 11s-IgA. Die 11s-IgA/Lactoferrin Quotienten beider Sekrete sind aber einander gleich (48,9 bzw. 50,0 mg /100 E). Ähnlich ist es bei Probe A9 und A10; die 11s-IgA-Konzentration beträgt in A9 3,2 mg/100 mg Prot., in A10 (artifizielle Blutbeimischung) 0,7mg/100 mg Protein. Die beiden 11s-IgA/Lactoferrin Werte wiederum sind mit 52,5 bzw. 51,8 mg/100 E praktisch identisch.

An der Probe A10 kann auch noch ein weiterer Vorteil der selektiven 11s-IgA-Bestimmung demonstriert werden. Wird, wie bisher üblich, das 11s-IgA mit einem Anti-IgA-Antiserum gemessen, so ergibt sich ein Wert von 2,63mg/100 mg Prot. Durch die selektive 11s-IgA-Bestimmung (anti-Secretory-Piece-Antiserum) aber erkennt man, daß nur etwa 1/4 des oben gemessenen IgA, nämlich 0,7mg/100 mg Prot., dem 11s-IgA entspricht.

Auf Grund der in Tab.4 wiedergegebenen Untersuchungsergebnisse für IgA⁺(mg /100mg Prot), 11s-IgA (mg /100 E Lactoferrin) und SC (Präzipitat im OUCHTERLONY-Test) lassen sich die pathologischen Proben in 8 verschiedene Gruppen unterteilen; die beiden Sekrete mit den artifiziellen Blutbeimengungen (A6, A10) werden hier nicht berücksichtigt.

Die Aussagen "erhöht, normal oder erniedrigt" beziehen sich auf die in Abschnitt 3 ermittelten altersabhängigen Normalwerte.

1. Die untersuchten Parameter (IgA, 11s-IgA, SC) zeigen keine Abweichungen von der in Abschnitt 3 ermittelten Altersnorm.

Pat.Nr.: A4, C17, C20, C31, C34, C35

-
- +) Die Untersuchungsergebnisse für IgA sind als die Konzentrationen zu verstehen, die mit RID in Anti-IgA-haltigem Gel gemessen werden; hierbei wird neben 11s-IgA auch das 7s-IgA erfaßt.

2. Kinder im 1. Lebensjahr:

IgA-erhöht, kein 11s-IgA, freie SC vorhanden

Pat.Nr.: A1, A2, A3, A7, A8, A11, A12

3. Kinder im 1. und 2. Lebensjahr:

IgA erhöht, 11s-IgA normal oder leicht erniedrigt,
freie SC vorhanden

Pat.Nr.: A14, C16

4. Kinder von 0 bis 14 Jahren:

IgA erhöht, 11s-IgA erhöht, keine freie SC nachweisbar

Pat.Nr.: A5, A9, A13, A15, A18, A19, A26, A27, C24, C28,
C36, C37

5. Kinder älter als 2 Jahre:

IgA normal, 11s-IgA erniedrigt, keine freie SC nachweisbar

Pat.Nr.: C40

6. Kinder älter als 2 Jahre:

IgA erniedrigt, 11s-IgA erniedrigt, freie SC vorhanden

Pat.Nr.: C29, C30, C38, C39

7. Kinder älter als 2 Jahre:

IgA erniedrigt, 11s-IgA erniedrigt, keine freie SC nachweis-
bar

Pat.Nr.: C22, C23

8. Kinder älter als 2 Jahre:

IgA sehr stark erniedrigt, kein 11s-IgA, freie SC vorhanden

Pat.Nr.: C21, C25, C32, C33

Bei der Betrachtung dieser Einteilung fällt auf, daß die IgA-Werte in 16 von 17 Sekreten der Patienten mit akuten, entzündlichen Erkrankungen erhöht sind. Dagegen ist bei den chronisch erkrankten Patienten die Sekret-IgA-Konzentration nur in 5 Proben erhöht, während sie in den übrigen 16 normal oder erniedrigt ist.

So können z.B. bei Patienten mit einer Mukoviszidose sowohl erhöhte (C24) und normale (C40) als auch erniedrigte (C23, C29, C30) IgA-Konzentrationen gemessen werden.

Die Serum-IgA-Konzentrationen zeigen mit Ausnahme des Patienten C25 keine Besonderheiten; bei diesem liegt mit einer IgA-Konzentration unter 20mg/100ml ein IgA-Mangel vor.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Gruppe 8 gerichtet. Bei den 3 Patienten dieser Gruppe ist kein 11s-IgA nachweisbar, obwohl die Kinder schon 3, 6, und 8 Jahre alt sind. Aus diesem Grunde wurde von ihnen eine Kasuistik angefertigt.

Kasuistik

1. Pat.Nr. 21

N.M. geb. 20.1.1970

Alter zum Zeitpunkt der Bronchoskopie: 3 Jhr.9Mo.

Anamnese:

Unauffällig bis November 1971

November 1971: Grippe der Schwester des Patienten → Patient bekommt Fieber und Husten; seit dem Schluckbeschwerden und starker Husten (Verdacht auf häufige Aspirat.).

Februar 1972: Starke Bronchitis und rezidivierende Pneumonien; Patient ist wenig belastungsfähig, angeschwollene Füße und Zyanose deuten auf eine Herzinsuffizienz.

Rö.: Cor pulmonale, ausgedehnte Bronchiektasen

1973 erneute Klinikaufnahme nötig; Dauerintubation und Beatmung sind über eine längere Zeit nötig

Ig-Bestimmung: IgA 266 mg%, IgM 322 mg%, IgG 2020 mg%

1974 Entlassung nach über einjährigem Krankenhausaufenthalt.

Diagnose: chronische eitrige Bronchitis

rezidivierende Pneumonien

ausgedehnte Bronchiektasen

Herzinsuffizienz

V.a. Sprachentwicklungsrückstand

2. Pat.Nr. C25

B.O. geb. 30.5.1968

Alter zum Zeitpunkt der Bronchoskopie: 5 Jhr. 10Mo.

Bei dem türkischen Jungen waren wegen Sprachschwierigkeiten keine ausführlichen anamnestischen Angaben zu eruieren. Bekannt ist nur, daß der Bub schon seit der Geburt an schweren, rezidivierenden Tracheobronchitiden leidet.

Befund bei der Klinikaufnahme im März 1974:

Junge kann praktisch nicht sprechen, scheint aber auf Laute zu reagieren

Urglasnägel an Finger und Zehen; starker Husten, über der Lunge auskult. verschärftes Atemgeräusch und grobblasige RG's; Rö.: Bronchiektasen beiderseits leicht disproportionierter Minderwuchs

Mukoviszidose konnte ausgeschlossen werden

EEG: o.B.

Sputumkultur: Candida, Pyocyaneus, hämoly. Streptokokken, Hämophilus influenzae

Elpho: Alb. 53%, α_1 3%, α_2 8%, β 8%, γ 28%

Ig-Bestimmung: IgA < 20 mg%, IgM 170 mg%, IgG 2030 mg%

Diagnose: angeborene oder seit langem erworbene Bronchiektasen beiderseits

schwere diffuse eitrig-tracheobronchitis

IgA-Mangel mit sek. Dystrophie

Sprachentwicklungsrückstand

3. Pat.Nr. C32, C33

E.B. geb. 20.3. 1966

Alter zum Zeitpunkt der Bronchoskopie: 7 Jhr. 6 Mo.

Anamnese:

1970: keine Vorkrankheiten bekannt, Sprachentwicklungsrückstand

1971: Masern, fraglicher Keuchhusten

Seit dieser Zeit hat sich die Patientin nicht mehr richtig erholt; sie ist ständig müde, erbricht häufig und klagt über ständigen Reizhusten

Rö: pulmonale Infiltrationen, Verd. auf Atelektase im Mittellappen; Sinusitis maxillaris beiderseits

EEG: o.B.

Immunglobuline normgerecht; AST 1200

1972: Rö: Atelektase des rechten Mittellappens; Sinusitis maxillaris

keine Besserung des Krankheitsbildes

1973: Fensterung der Kieferhöhlen

Rö: Atelektase im rechten Mittellappenresektion rechts

November 1973: OP - Mittellappenresektion rechts

Elpho: Alb. 62%, α_1 4%, α_2 10%, β 9%, γ 15%

Ieph: kein Mangel an - Antitrypsin

Ig-Bestimmung: IgA 138 mg%, IgM 202 mg%, IgG 1203 mg%

1974: unter dauernder Behandlung und ambulanter Überwachung tritt eine leichte Besserung ein.

Diagnose: rezidivierende Pneumonien

Sinusitis maxillaris

Glomerulonephritis

sek. Anämie

Sprachentwicklungsrückstand

B. Diskussion

Obwohl man glaubt, daß dem 11s-IgA eine wichtige Rolle in der Pathogenese und dem Verlauf von bronchialen Infektionen zukommt, ist man noch weit davon entfernt, das lokale Immunsystem zu verstehen.

Immer wieder taucht die Frage auf, ob nicht ein Mangel an 11s-IgA ätiologisch für Erkrankungen der Bronchialorgane verantwortlich sein könnte.

In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Untersuchungsergebnisse.

Bei chronischen Erkrankungen der Respirationsorgane fanden LEWIS et al. (49) IgA vermehrt im Speichel, während BRASHER et al. (14), MEDICI und Mitarbeiter (58), BARDARE et al. (3) in diesen Fällen eine eher verminderte IgA-Konzentration bestimmten.

GUGLER et al. (35) wiesen bei Mukoviszidose einen erhöhten IgA-Spiegel im Speichel nach, während er bei dieser Krankheit von SOUTH und Mitarbeitern (84) als normal bestimmt wurde.

Keinen Unterschied in der IgA-Konzentration im Sekret zwischen gesunden und kranken Kindern konnten HOBDAV et al. (41) und HAWORTH et al. (39) bei Asthma und Infekten feststellen.

In all diesen Untersuchungen wird das IgA im Sekret mittels eines Anti-IgA-Antiserums bestimmt, d.h. es wird nicht unterschieden zwischen 11s-IgA und 7s-IgA, das durch Transsudation bzw. Exsudation in das Sekret gelangen kann.

Außerdem werden die IgA-Konzentrationen meist nur im Speichel bzw. im Sputum bestimmt, d.h. die Sekrete stammen nicht von den Stellen, die bei den untersuchten Krankheiten pathologisch verändert sind. Günstiger wäre es, wenn bei Bronchitiden, Bronchiektasen oder Mukoviszidosen die Bronchialsekrete, die ja die pathologisch veränderten Schleimhäute umspülen, untersucht würden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sekrete direkt unter Sicht aus dem entzündlich oder degenerativ veränderten Tracheobronchialsystem, d.h. aus der Trachea oder einem der beiden Hauptbronchien, entnommen. Das 11s-IgA wurde darin selektiv bestimmt und in Relation zu Lactoferrin gesetzt. Wie schon in Abschnitt 2 gesagt (Seite 57), wird die 11s-IgA-Konzentration, ausgedrückt in 11s-IgA/100 E Lactoferrin, bei chronischen Erkrankungen des Bronchialsystems evtl. zu hoch gemessen, bei akuten Infekten vielleicht etwas zu niedrig bestimmt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber nun, daß das 11s-IgA in den chronischen Fällen meist erniedrigt, in den akuten aber erhöht ist. Daraus ist zu schließen, daß die beobachteten Veränderungen der 11s-IgA-Konzentrationen nicht auf dem Bezugswert Lactoferrin beruhen, sondern durch ihn eher noch abgeschwächt werden.

Die verschiedenen untersuchten Proben wurden entsprechend den gemessenen IgA-Konzentrationen bereits weiter vorne in acht verschiedene Gruppen unterteilt. Diese können nun in 6 Sparten (I-VI) zusammengefaßt werden.

Hierbei ist zu beachten, daß, wie schon im Abschnitt 3 gesagt, verschiedene Konstellationen, die beim Säugling normal sind, bei älteren Kindern und Erwachsenen physiologischsweise nicht mehr gefunden werden.

I. Gruppe 2: Kinder im 1. Lebensjahr:

7s-IgA erhöht, kein 11s-IgA, freie SC vorhanden

Gruppe 3: Kinder im 1. und 2. Lebensjahr:

IgA erhöht, 11s-IgA normal oder leicht erniedrigt, freie SC vorhanden

Gruppe 4: Kinder von 0 - 14 Jahren:

IgA erhöht, 11s-IgA erhöht, keine freie SC nachweisbar

Gemeinsam ist diesen 3 Gruppen, daß eine erhöhte IgA-Konzentration im Sekret gefunden wird.

Die freie SC und das nicht vorhandene bzw. verminderte 11s-IgA in den Gruppen 2 und 3 ist, wie in Abschnitt 3 beschrieben, während des 1. und 2. Lebensjahres physiologisch.

In der Gruppe 4, bei Kindern in einem späteren Lebensalter, wird keine freie SC, dafür aber eine erhöhte 11s-IgA-Konzentration gefunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Die Plasmazellen der Submukosa der Schleimhaut sind in der Lage, auf einen antigenen Reiz hin vermehrt IgA zu produzieren; da sowohl 11s-IgA (Gr.4) als auch die freie SC (Gr.2,3) normal bzw. vermehrt ist, kann auch eine Schädigung der SC-produzierenden Epithelzellen der Tracheobronchialschleimhaut ausgeschlossen werden.

II. Gruppe 5: Kinder älter als 2 Jahre:

IgA normal, 11s-IgA erniedrigt, keine freie SC
nachweisbar

Diese Konstellation spricht dafür, daß die IgA-Produktion durch die submukösen Plasmazellen noch normal erfolgen kann, während es durch eine Schädigung der Epithelzellen zu einer Verminderung von SC und damit von 11s-IgA kommt.

III. Gruppe 6: Kinder älter als 2 Jahre:

IgA-erniedrigt, 11s-IgA erniedrigt, freie SC
vorhanden

Die Erniedrigung sowohl des IgA als auch des 11s-IgA deutet auf eine Schädigung der submukösen Plasmazellen hin; die frei nachzuweisende SC zeigt, daß die Epithelzellen noch relativ intakt sind.

IV. Gruppe 7: Kinder älter als 2 Jahre:

IgA erniedrigt, 11s-IgA erniedrigt, keine
freie SC nachweisbar

Die Verminderung des IgA spricht für eine Schädigung der submukösen Plasmazellen; hinzu kommt noch, wie die verminderte 11s-IgA-Konzentration bei nicht nachweisbarer freier SC zeigt, ein Defekt der SC-produzierenden Epithelzellen.

V. Gruppe 8: Kinder älter als 2 Jahre:

IgA sehr stark erniedrigt, kein 11s-IgA,
freie SC vorhanden

Die sehr starke IgA-Verminderung deutet auf eine schwere Schädigung der submukösen Plasmazellen hin; die bei allen 3 Patienten nachweisbare freie SC spricht dafür, daß ein Teil der Epithelzellen noch funktionsfähig ist. Einen Sonderfall stellt Pat.Nr.C25 dar. Wie das Serum-IgA $< 20 \text{ mg\%}$ zeigt, liegt bei diesem Patienten ein IgA-Mangel vor; dadurch wird das stark erniedrigte Sekret-IgA erklärbar.

Die Serum-IgA-Konzentrationen der beiden anderen Patienten sind normal.

Das Außergewöhnliche an dieser Gruppe ist jedoch, daß kein 11s-IgA nachweisbar ist.

Bei der Betrachtung der Krankengeschichten der 3 Patienten ergibt sich folgendes:

Alle 3 Kinder leiden an schwersten chronisch-rezidivierenden entzündlichen und degenerativen Erkrankungen der Respirationsorgane, die mit Bronchiektasen einhergehen. Der Anfang der Erkrankung kann in einem Fall nicht exakt ermittelt werden, bei den beiden anderen Kindern begann es etwa mit dem 2. bzw. 5. Lebensjahr; vorausgegangen waren Masern, ein fraglicher Keuchhusten bzw. eine Grippe mit Fieber und Husten. Auffällig ist auch, daß bei allen 3 Kindern ein Sprachentwicklungs-rückstand zu beobachten war.

Es stellt sich nun folgende Frage:

Ist ein primärer 11s-IgA-Mangel für die äußerst schweren, chronisch rezidivierenden Erkrankungen verantwortlich

oder aber wurde durch die chronischen entzündlichen Vorgänge die Schleimhaut so stark geschädigt, daß sekundär eine ausreichende IgA-Produktion der submukösen Plasmazellen und eine, wahrscheinlich enzymatisch bedingte, Kopplung zwischen SC und IgA nicht mehr möglich war?

Im letzteren Fall würde die Konstellation eine Verschlechterung des unter III genannten Krankheitsbildes darstellen. Ein primärer 11s-IgA-Mangel würde dann vorliegen, wenn bei vorhandenem IgA und SC die enzymatische Kopplung dieser beiden Komponenten von Geburt an gestört wäre. Die Frage, ob der 11s-IgA-Mangel bei den 3 Patienten nun primär oder sekundär ist, kann nicht beantwortet werden. Der späte Beginn der Erkrankung (3. bzw. 5. Lebensjahr) spricht vielleicht eher dafür, daß die fehlende oder sehr stark verminderte 11s-IgA-Bildung durch die schweren Schädigungen der Schleimhaut des Tracheobronchialsystems erst sekundär hervorgerufen wurde.

VI. Gruppe 1: Kinder von 0 bis 14 Jahren:

IgA, 11s-IgA und SC zeigen keine Abweichungen von der zuvor ermittelten Altersnorm

Dieser Befund kann auf zwei Arten gedeutet werden:

1. Die Schleimhaut ist noch völlig intakt und zur normgerechten Bildung von IgA, 11s-IgA und SC fähig. Dieser Deutung steht entgegen, daß 5 der 6 Patienten dieser Gruppe an chronischen Erkrankungen der Atemwege leiden.
2. Deshalb ist es wahrscheinlicher, daß diese scheinbaren Normwerte einen Zustand widerspiegeln, in dem die Schleimhaut infolge der chronischen Schädigung nicht mehr fähig ist, auf die antigenen Reize mit einer überschießenden IgA-Produktion, wie es physiologisch wäre, zu reagieren. In diesem Fall würde Sparte VI einen Übergang zwischen Zustand I und III darstellen.

Zusammenfassend ist folgendes zu sagen:

Bei akuten Infekten erfolgt, unabhängig vom Lebensalter, eine überschießende IgA-Produktion der submukösen Plasmazellen. Diese Reaktion ist sinnvoll und kann auch noch bei chronischen Erkrankungen beobachtet werden, solange die Funktionen der Schleimhaut noch intakt sind. Bei chronisch-rezidivierenden Veränderungen kommt es mit zunehmendem Schweregrad und längerer Erkrankungsdauer zu einem Absinken der IgA-Konzentration. In dieser Hinsicht kann kein Unterschied zwischen Mukoviszidosen und anderen chronischen entzündlichen oder degenerativen Erkrankungen des Respirationstraktes nachgewiesen werden. Dieses Absinken der IgA-Konzentration konnte auch schon von BÜRGI et al. (15) festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß infolge schlechter werdender Vaskularisation, vermehrter Fibrosierung und Vernarbung das Einwandern von Plasmazellen und Lymphozyten in das submuköse Gewebe erschwert wird. Die in zu geringer Anzahl vorhandenen Plasmazellen produzieren dann zu wenig IgA. Unabhängig davon kann es auch zu einer Schädigung der Epithelzellen der Schleimhaut kommen. Entsprechend dem Ausmaß der Schädigung ist die Produktion von sekretorischer Komponente (SC) vermindert. So kann es auch bei ausreichender IgA-Produktion der Plasmazellen zu einer Verminderung der 11s-IgA-Konzentration kommen.

Das 11s-IgA ist aber auch dann vermindert, wenn, theoretisch vorstellbar, die, wahrscheinlich enzymatisch erfolgende, Kopplung zwischen dem IgA und der SC gestört ist. Eine derartige Störung könnte sowohl primär genetisch, als auch sekundär durch degenerative Vorgänge an den Schleimhäuten hervorgerufen werden.

Pathophysiologisch sind also 3 Gründe für eine verminderte 11s-IgA-Konzentration im Sekret möglich:

1. Infolge Fibrosierung und Vernarbung wird von einer zu geringen Zahl an Plasmazellen in der Submukosa zu wenig IgA produziert.

2. Infolge einer Schädigung der Epithelzellen der Schleimhaut kommt es zu einer verminderten Produktion von sekretorischer Komponente (SC)
3. Infolge einer Störung der Kopplung zwischen IgA und SC kommt es zu keiner 11s-IgA-Bildung.

Im zweiten Fall ist zwar genügend IgA vorhanden, es besteht aber der Verdacht, daß dieses IgA ohne die sekretorische Komponente in den Sekreten viel empfindlicher gegenüber einer Proteolyse und so immunologisch insuffizient ist.

Auf Grund dieser Ergebnisse lassen sich vielleicht verschiedene Unstimmigkeiten in der Literatur erklären; so ist es z.B. durchaus möglich, daß ein chronisch erkrankter Patient, je nach dem morphologischen Zustand seiner Schleimhaut, zu hohe, normale oder zu niedrige IgA-Konzentrationen in seinem Sekret besitzt (siehe Pat. mit Mukoviszidose Seite 85).

Die Bestimmung der IgA-bzw. 11s-IgA-Konzentrationen gibt also, von einem eventuell möglichen genetisch bedingten 11s-IgA-Mangel abgesehen, keine Auskunft über die Ätiologie einer Erkrankung, sondern hilft dabei, den funktionellen Zustand der Schleimhäute zu erfassen.

5. Immunglobulinbestimmungen im Sputum und Serum nach i.v.
Injektion eines IgM/IgA-Konzentrates bei einem Patienten
mit einer Agammaglobulinämie (Typ BRUTON)

Betrachtet man die Ergebnisse aus Abschnitt 4, so sieht man, daß im Falle einer chronischen Erkrankung des Tracheobronchialsystems ein "circulus vitiosus" in Kraft tritt; durch die dauernde Schädigung der Schleimhaut kommt es zu einer verminderten lokalen Produktion von IgA und SC und damit von 11s-IgA. Dieser Mangel an 11s-IgA bewirkt, daß Bakterien und Viren an der Schleimhaut nicht mehr aufgehalten werden können. Es kommt zu weiteren Infektionen und so zu immer schwereren Schädigungen der Schleimhäute.

Eine Möglichkeit, diesen Kreis zu durchbrechen, liegt vielleicht darin, das IgA der Schleimhaut zu substituieren. Es stellt sich aber die Frage, inwieweit parenteral zugeführtes IgA im Sekret erscheint. Wird es passiv ins Sekret transsudiert, wird es aktiv transportiert, erscheint es als 7s-IgA oder als 11s-IgA im Sekret?

Die Frage, ob Immunglobuline nach parenteraler Injektion überhaupt im Sekret erscheinen, wird in der Literatur unterschiedlich beantwortet.

TOMASI (92), HAWORTH (39) und SELNER (76) konnten nach parenteraler Gabe von markiertem IgA und IgG bzw. nach Austauschtransfusionen bei Neugeborenen keinen Transport von IgA aus dem Serum ins Sekret feststellen.

Hingegen gelang es BUTLER (19) nach intravenöser Injektion von radioaktiv markierten 7s- und 11s-IgA-Präparationen diese auch im Nasalsekret nachzuweisen. Das injizierte 7s-IgA hatte sein Sedimentationsverhalten nicht verändert, d.h. es hatte sich nicht mit SC zum 11s-IgA verbunden.

SOUTH (83) wies, nach Infusion von Normalserum bei Patienten mit einer Agammaglobulinämie, IgA im Gegensatz zu IgG und IgM im Speichel nach.

A. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden die IgA-, IgM-, IgG- und Albumin-Konzentrationen im Serum und Sputum vor und bis zu 4 Tagen nach i.v.-Injektion eines Immunglobulin-Konzentrates gemessen. Das verwendete Konzentrat der Fa. BIOTEST enthält eine Anreicherung von Immunglobulinen (Gesamtprotein: 5g%, 7s-IgA: 600mg%, IgM 1200mg%, IgG 1100mg%).

Von dem Präparat wurden 50ml verabreicht, d.h. es wurden 300mg 7s-IgA injiziert.

Bei dem Patienten, an dem diese Untersuchung durchgeführt wurde, handelt es sich um einen 14-jährigen Jungen mit einer Agammaglobulinämie (Typ BRUTON); er eignet sich deshalb besonders für diese Studie, da er kaum über eigenes IgA verfügt (Serum IgA: 1,5mg%).

Das IgA, IgM, IgG und Albumin im Serum und Sputum wurde mit käuflichen Immundiffusionsplatten (BEHRINGWERKE) gemessen. Von jeder Probe wurde außerdem die Gesamtproteinkonzentration (nach FÜHR/HINZ) ermittelt und eine OUCHTERLONY-Geldiffusion angefertigt. Im OUCHTERLONY-Test zeigte sich bei allen Proben nur freie SC. 7s-IgA oder 11s-IgA konnten, auf Grund mangelnder Empfindlichkeit dieser Methode, in keinem Sputum, weder vor noch nach der Injektion, nachgewiesen werden.

Die IgA-Bestimmung im Sekret erfolgte nur mit anti-IgA-Immundiffusionsplatten (LC-PARTIGEN, BEHRINGWERKE; Meßbereich 1-10mg%) und einem 7s-IgA Standard; der Grund hierfür liegt in der schon erwähnten Aussage von BUTLER (19), daß injiziertes Serum-7s-IgA unverändert im Sekret erscheint.

Aus den gemessenen Proteinkonzentrationen werden sowohl im Serum als auch im Sputum folgende Quotienten errechnet und miteinander verglichen:

Albumin/IgA, Albumin/IgG und Albumin/IgM

Serumuntersuchung

Nr	Datum		IgA mg%	IgG mg%	IgM mg%	Albumin mg%
vor Injektion						
1	16.11	9.30	1,5	84	72	5460
Injektion von 50ml Konzentrat (16.11. 10.15-10.30)						
2	16.11	11.30	16	93	67,5	5400
3	16.11	13.30	16,2	93	81,5	5500
4	16.11	16.30	14,7	105	90	5420
5	17.11	10.00	13	109	78	5380
6	17.11	15.00	13	109	78	5380
7	18.11	10.00	10,5	109	78	5400
8	18.11	15.00	10,5	109	78	5400
9	19.11	10.00	7,2	106	70	5300
10	20.11	10.00	7,8	98	86	5350

Das Serum-IgA steigt nach Injektion sofort auf etwa das 10-fache des Ausgangswertes an. Die IgA-Konzentration fällt dann mit einer Halbwertszeit von etwa 3 Tagen wieder ab. Die beiden anderen Immunglobuline, IgM und IgG zeigen nur einen geringen Anstieg ihrer Konzentrationen nach Gabe des Konzentrates.

Die untersuchten Sputumproben wurden zum gleichen Zeitpunkt wie die Seren entnommen (siehe obige Tabelle)

Sputumuntersuchung

Sputum					Serum		
Nr	IgA mg/100mg Prot.	Alb/IgA	Alb/IgG	Alb/IgM	Alb/IgA	Alb/IgG	Alb/IgM
1	<0,007	>1100,0	>22	44,0	3640	65,0	75,8
2	0,03	334,6	51,2	28,1	337,5	58,1	80,0
3	0,05	177,8	>32	17,8	339,5	59,1	67,5
4	0,08	90,6	44,1	16,1	368,7	51,6	60,2
5	0,09	80,0	46,9	31,3	413,8	49,4	69,0
6	0,08	83,8	44,3	11,1	413,8	49,4	69,0
7	0,1	74,6	50,6	26,0	514,3	49,5	69,2
8	0,08	170,0	>17	15,5	514,3	49,2	69,2
9	0,06	116,7	>28	15,6	736,0	50,0	75,7
10	0,03	237,5	38,0	17,9	685,9	54,6	62,2

Auch die IgA-Konzentration im Sputum steigt sofort nach der Injektion auf das über 5-fache an ($0,007 \rightarrow 0,03$). Dieser Wert erhöht sich noch weiter bis auf $0,1\text{mg}/100\text{mg Prot.}$ am zweiten Tag. Das Verhältnis Alb/IgA ist sofort nach der Injektion in Serum und Sekret gleich; bei den folgenden Proben ist es im Sekret niedriger als im Serum. Alb/IgM ist in allen Sputumproben gegenüber dem Serum erniedrigt, während Alb/IgG in beiden biologischen Flüssigkeiten gleich ist.

B. Diskussion

Auf Grund der durchgeführten Versuche kann eindeutig gezeigt werden, daß i.v. injiziertes 7s-IgA im Sekret erscheint. Die Frage, ob das Serum-IgA unverändert oder gekoppelt mit SC als 11s-IgA dorthin gelangt, kann aufgrund mangelnder Empfindlichkeit der angewandten Methode hier nicht beantwortet werden. Aufgrund der Untersuchungen von BUTLER (19) kann aber angenommen werden, daß das IgA auf seinem Weg vom Serum ins Sekret nicht verändert wird.

Ein weiteres noch ungelöstes Problem ist, auf welche Weise das IgA vom Serum ins Sekret gelangt, ob durch passive Transsudation oder durch aktiven Transport. Bei der Beantwortung dieser Frage hilft die Beziehung Alb/IgA. Der Bezug auf Albumin wird, wie schon in Abschnitt 3 gesagt, gewählt, weil Albumin nur in der Leber produziert und ausschließlich durch passive Serumtranssudation im Sekret erscheint.

Würde das IgA nur durch passive Transsudation von Serum ins Sekret gelangen, so müßte Alb/IgA im Serum und Sputum identisch sein. Dieser Zustand kann 1 Std. nach Injektion des Konzentrates beobachtet werden. Später jedoch sinkt Alb/IgA im Sekret gegenüber dem Serum ab, d.h. die IgA-Konzentration, bezogen auf Albumin, ist im Sputum im Vergleich zum Serum erhöht. Dieses Verhalten deutet auf einen aktiven Transport des IgA hin.

Gegen eine ausschließlich passive Transsudation spricht auch noch folgender Befund.

Im Serum ist schon eine Stunde nach Injektion die höchste IgA-Konzentration (etwa das 10-fache des Ausgangswertes) erreicht; nach etwa 3 Tagen ist diese auf die Hälfte abgesunken. Im Sputum hingegen ist die IgA-Konzentration nach 2 Tagen am größten; 4 Tage nach der Gabe des Konzentrats ist noch genausoviel IgA im Sekret enthalten als unmittelbar nach der Injektion.

Auch die Alb/IgM-Werte sind in allen Sputumproben gegenüber dem Serum erniedrigt. Diese Beobachtungen würden, nach dem oben Gesagten, für einen Transport des IgM ins Sekret oder aber für eine lokale Produktion des IgM in der Schleimhaut sprechen. Eine derartige Situation konnte auch von BRANDTZAEG (10,8) bei Patienten mit einer selektiven IgA-Immundefizienz beobachtet werden.

Der Quotient Alb/IgG ist in allen untersuchten Sputum- und Serumproben gleich, d.h. das IgG erscheint nur durch passive Serumtranssudation im Sekret. Diese Tatsache wird auch von BRANDTZAEG (10) und KEIMOWITZ (16) bestätigt.

Zusammenfassend kann also folgendes gesagt werden:

IgA erscheint nach intravenöser Gabe sofort durch passive Transsudation im Sekret; kurze Zeit darauf macht sich bereits ein Transportmechanismus bemerkbar, der zusätzlich zur passiven Diffusion IgA aktiv ins Sekret bringt. Ein derartiger selektiver Transportmechanismus für IgA kann evtl. auch physiologischerweise neben der lokalen Produktion durchaus von Bedeutung sein.

Obwohl dem Patienten 50ml eines Immunglobulinkonzentrates mit einem hohen IgA-Gehalt verabreicht wurden, ist es fraglich, ob die im Sekret erscheinende IgA-Menge ausreicht, um irgendwelche therapeutischen Erfolge zu erzielen.

Trotzdem ist es wahrscheinlich den Versuch wert, bei einem größeren Kollektiv von Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen den lokalen IgA-Mangel mit parenteraler Injektion von IgA zu vermindern. WIERSEBITZKY (106) konnte bei Kindern mit chronischen Atemwegserkrankungen nach i.v. Injektion eines Immunglobulinpräparates eine Besserung des Krankheitsbildes beobachten.

Am günstigsten wäre es natürlich, theoretisch überlegt, wenn es gelingen würde, das 11s-IgA über einen Ultraschallvernebler zu inhalieren; das IgA müßte so nicht erst durch die Schleimhaut transportiert werden und wäre außerdem in der biologisch aktiven 11s-IgA-Form vorhanden. Interessant ist aber auch das Verhalten des IgM. Es wird anscheinend ähnlich wie das IgA aktiv transportiert oder aber lokal produziert. Ob dieser Befund physiologisch ist oder ob das IgM nur bei einem exzessiven IgA-Mangel vermehrt ins Sekret gelangt, um dort evtl. das IgA zu vertreten, soll im nächsten Abschnitt geklärt werden.

6. Bestimmung weiterer Serumproteine im Tracheobronchialsekret

Während sich in der Vergangenheit viele Autoren um Untersuchungen der Immunglobuline, im besonderen des IgA, bemühten, wurde nur wenig über quantitative Bestimmungen weiterer Serumproteine in Sekreten bekannt.

In der vorliegenden Arbeit werden Albumin (Molekulargewicht MG 69000), α_1 -Antitrypsin (MG 45000), Coeruloplasmin (MG 160000), α_2 -Macroglobulin (MG 820000), β_1 -Globulin, IgG (MG 160000), IgM (MG 1000000) sowohl in den Sekreten als auch in den entsprechenden Seren bestimmt.

Es soll vor allem der Frage nachgegangen werden, ob die genannten Eiweiße passiv aus dem Serum in die Sekrete transsudieren, oder ob auch bei ihnen, ähnlich wie beim IgA, ein Anhalt für eine lokale Produktion oder einen selektiven Transport vom Serum ins Sekret besteht.

Untersucht wurden 73 der insgesamt 75 Tracheobronchialsekrete und die dazugehörigen Seren (zu 2 Sekreten konnte das entsprechende Serum nicht mehr beschafft werden).

Die Sekrete werden in zwei Gruppen geteilt:

- a) Proben von Patienten ohne pathologische Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut
- b) Proben von Patienten mit entzündlichen oder degenerativen Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut

Eine weitere Einteilung nach dem Alter der Patienten erfolgte nicht.

Durchführung

Das Albumin, IgG und IgM wurde mit käuflichen Immundiffusionsplatten bestimmt. (BEHRINGWERKE)

Albumin: M-Partigen-Immundiffusionsplatten; Meßbereich
50-600mg/100ml

IgG: je nach Proteinkonzentration entweder LC-Partigen- (Meßbereich 1-10mg/100ml) oder Tri-Partigen Immundiffusionsplatten (Meßbereich 20-200mg/100ml)

IgM: je nach Proteinkonzentration entweder LC-Partigen- (Meßbereich: 1-10mg/100ml) oder S-Partigen-Immundiffusionsplatten (Meßbereich 8-90mg/100ml)

Die käuflichen Platten zur Bestimmung des α_1 -Antitrypsin, Coeruloplasmin, α_2 -Macroglobulin und β_2 -Globulin sind zu unempfindlich, um die geringen Konzentrationen dieser Proteine in den Sekreten zu erfassen.

Deshalb wurden Immundiffusionsplatten für diese Eiweiße, wie auf Seite 22 beschrieben, selbst hergestellt. Hierzu wurden monospezifische Antiseren der BEHRINGWERKE benutzt. Die Bezugswerte für die Erstellung der Eichkurven wurden durch Verdünnungen eines Standard-Humanserums (BEHRINGWERKE) gewonnen.

	Antiserumkonzentration im Gel	Meßbereich
α_1 -Antitrypsin	0,8%	0,5-10mg/100ml
Coeruloplasmin	0,8%	0,5- 7mg/100ml
α_2 -Macroglobulin	0,8%	1,5-15mg/100ml
β_1 A-Globulin	0,8%	0,5-10mg/100ml

Durch Behandlung mit Tannin wurden die entstehenden Immunpräzipitate besser sichtbar gemacht.

Bei einigen Proben ergaben sich nur diffuse Präzipitationsringe. Diese Sekrete, deren Proteinkonzentrationen den Meßbereich der selbstangefertigten Immundiffusionsplatten überschritten, wurden nochmals mit käuflichen Platten (M-Partigen-Immundiffusionsplatten BEHRINGWERKE) untersucht.

Zur Bestimmung der Proteine im Serum benützten wir ebenfalls Immundiffusionsplatten der BEHRINGWERKE.

A. Ergebnisse

Aus den gemessenen Proteinkonzentrationen wurden, sowohl in den Sekreten als auch in den Seren, folgende Quotienten errechnet:

Albumin/ α_1 -Antitrypsin; Albumin/ α_2 -Macroglobulin; Albumin/Coeruloplasmin; Albumin/ β_1 A-Globulin; Albumin/IgG; Albumin/IgM. Aus den erhaltenen Werten wurden jeweils Mittelwert $\pm$ Standardabweichung gebildet.

Gruppe a) Patienten ohne pathologische Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut

	Tracheobronchialsekret	Serum
Albumin/ α_1 -Antitrypsin		
	x = 14,57 $\pm$ 3,59 n = 34	x = 16,36 $\pm$ 4,73
Albumin/ α_2 -Macroglobulin		
	x = 19,27 $\pm$ 6,84 n = 34	x = 17,89 $\pm$ 6,41
Albumin/Coeruloplasmin		
	x = 112,9 $\pm$ 51,4 n = 19	x = 136,5 $\pm$ 59,4
Albumin/ β_1 A-Globulin		
	x = 44,6 $\pm$ 9,97 n = 32	x = 52,8 $\pm$ 12,5
Albumin/IgM		
	x = 28,4 $\pm$ 10,57 n = 29	x = 33,6 $\pm$ 13,13
Albumin/IgG		
	x = 5,11 $\pm$ 2,19 n = 34	x = 5,88 $\pm$ 2,74

Gruppe b) Patienten mit entzündlichen oder degenerativen Veränderungen der Tracheobronchialschleimhaut

Tracheobronchialsekret			Serum	
Albumin/ α_1 -Antitrypsin				
x = 12,49 $\pm$ 3,2	n = 39		x = 12,6 $\pm$ 2,92	
Albumin/ α_2 -Macroglobulin				
x = 17,4 $\pm$ 6,88	n = 39		x = 16,17 $\pm$ 5,85	
Albumin/Coeruloplasmin				
x = 126,56 $\pm$ 41,91	n = 33		x = 138,63 $\pm$ 41,31	
Albumin/ β_2 -Globulin				
x = 47,67 $\pm$ 14,73	n = 39		x = 52,43 $\pm$ 14,19	
Albumin/IgM				
x = 27,1 $\pm$ 14,89	n = 37		x = 27,06 $\pm$ 14,9	
Albumin/IgG				
x = 4,45 $\pm$ 2,4	n = 37		x = 4,8 $\pm$ 2,6	

Es ist klar zu ersehen, daß die berechneten Quotienten im Tracheobronchialsekret und Serum sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Dies gilt sowohl für Gruppe a als auch für Gruppe b.

Zum Vergleich sei noch einmal auf das Verhältnis Albumin/IgA in den Sekreten verwiesen (siehe Abschnitt 3, S.66). Hier ist das IgA, bezogen auf Albumin, im Sekret 10-30 mal höher konzentriert als im Serum.

B. Diskussion

Die Auswahl der untersuchten Proteine geschah auch unter dem Aspekt des Molekulargewichtes; so wurden neben Proteinen mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht (Z.B. α_1 -Antitrypsin MG 45.000) auch solche mit einem sehr hohen bestimmt (α_2 -Macroglobulin MG 820.000; IgM MG 1.000.000).

Es wäre durchaus vorstellbar, daß physiologischerweise und bei geringgradigen Entzündungen nur Eiweiße mit einem niedrigen Molekulargewicht die Schleimhaut durchdringen können, während hochmolekulare Serumproteine nur bei schweren entzündlichen Veränderungen im Sekret erscheinen.

Aus den Tatsachen, daß sämtliche berechneten Quotienten

(Albumin/ α_1 -Antitrypsin, Albumin/ α_2 -Macroglobulin, Albumin/Coeruloplasmin, Albumin/ β_1 A-Globulin, Albumin/IgG, Albumin/IgM) im Serum sich nicht wesentlich von denen im Tracheobronchialsekret unterscheiden und daß das Bezugsprotein Albumin nur durch passive Transsudation im Sekret erscheint (46), ist folgendes zu schließen:

Alle hier untersuchten Proteine gelangen nur durch eine passive Diffusion oder durch einen gemeinsamen Transportmechanismus aus dem Serum ins Sekret. Es besteht kein Anhalt für einen speziellen aktiven Transport oder eine lokale Produktion eines der Eiweiße. Dies gilt sowohl für Patienten mit als auch für solche ohne pathologische Veränderungen des Respirationstraktes. Die passive Transsudation bzw. Exsudation erfolgt auch unabhängig vom Molekulargewicht des Proteins.

Unterschiedlich ist nur das Ausmaß der Serumtranssudation. Im Normalfall beträgt die Albuminkonzentration $10,22 \pm 2,79$ mg/100mg Gesamtprotein (siehe Seite 65) und damit der Anteil der Serumproteine am Gesamteiweiß des Tracheobronchialsekretes etwa 20%. Bei schweren entzündlichen oder degenerativen Veränderungen kann das Albumin bis auf über 30 mg/100mg Gesamtprotein ansteigen; in diesen Fällen besteht dann das Sekretprotein etwa zu 60% aus Serumeiweißen.

Die quantitative Bestimmung von Serumproteinen im Sekret ist also, von verschiedenen Ausnahmen abgesehen, nicht sinnvoll, da diese im gleichen Verhältnis zueinander vorliegen wie im Serum; die quantitative Messung dieser Eiweiße im Serum ist somit völlig ausreichend.

Von dieser Regel sind, außer dem Immunglobulin A, folgende Proteine ausgenommen:

- a) Albumin: Der Anteil des Albumins am Gesamtprotein des Sekrets gibt einen guten Hinweis auf das Ausmaß der Serumtranssudation bzw. Exsudation ins Sekret und damit evtl. auf den Grad der Schädigung der Schleimhaut.
- b) IgM: Bei den in diesem Kapitel untersuchten Proben hat es den Anschein, als würde auch das IgM nur durch passive Diffusion vom Serum ins Sekret gelangen. Dies scheint auch im Normalfall zuzutreffen. Bei

einem excessiven IgA-Mangel kann das IgM aber, wie in Abschnitt 5 zu sehen ist, selektiv transportiert oder lokal produziert werden, um für das IgA im Sekret einzuspringen (10).

- c) IgG: Obwohl es in den durchgeführten Untersuchungen so aussieht, als würde für das Sekret-IgG nur ein passiver Serumdurchtritt von Wichtigkeit sein, könnte theoretisch auch für dieses Immunglobulin das unter b) Gesagte gelten.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Die beiden quantitativ am stärksten vertretenen Serumproteine im Tracheobronchialsekret sind das Albumin und das IgA.

Daneben sind auch sämtliche anderen Serumeiweiße im Sekret vertreten; sie gelangen mittels einer passiven Diffusion durch die Schleimhaut dorthin. Diese Transsudation bzw. Exsudation ist sowohl bei gesunden als auch bei kranken Probanden nachweisbar; unterschiedlich ist nur das Ausmaß dieses Übertritts.

Zusätzlich wird physiologischerweise IgA lokal in der Schleimhaut produziert und evtl. auch aktiv vom Serum ins Sekret transportiert.

Eine derartige lokale Produktion bzw. aktive Transportierung ist auch für das IgM bei einem Patienten mit einem IgA-Mangel nachgewiesen.

7. Übersichtsdarstellung der Proteine des Tracheobronchialsekrets

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde immer nur über quantitative Bestimmungen einzelner Proteine im Sekret berichtet. Hier wurde nun versucht, eine Methode zu finden, ähnlich der Elektrophorese bzw. Immunelektrophorese im Serum, mit der es möglich ist, gleichzeitig mehrere Eiweiße qualitativ oder quantitativ im Tracheobronchialsekret zu beurteilen. Dabei sind 2 Punkte zu beachten:

- a) Aufgrund der nur in geringer Menge vorhandenen, eiweißarmen Proben müssen die Methoden sehr empfindlich und materialsparend sein.
- b) Um qualitative bzw. semiquantitative Aussagen machen zu können, sollten die untersuchten Proben immer etwa den gleichen Gesamtproteingehalt aufweisen. Die in dieser Arbeit verwendeten Spülflüssigkeiten wurden so verdünnt bzw. konzentriert, daß ihr Gesamteiweißgehalt 600mg/100ml betrug.

Es wurden die folgenden Methoden angewandt:

- a) Einfache Immunelektrophorese (33)
- b) Zweidimensionale Immunelektrophorese nach CLARKE/FREEMAN (21)
- c) Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese (97)

A. Ergebnisse

a) Einfache Immunelektrophorese

10 Tracheobronchialsekrete sowohl von Gesunden als auch von Kranken (Gesamtprotein: 600mg/100ml) wurden mit der Immunelektrophorese aufgetrennt.

Als Antiserum wurde Anti-Human-Serum vom Kaninchen (BEHRING-WERKE) benutzt, d.h. es stellten sich nur Serumproteine dar.

Mit dieser Methode waren qualitative, evtl. semiquantitative Aussagen möglich. Es ergaben sich bei der Untersuchung der Sekrete meist nur 2 Präzipitationslinien; die eine Linie entsprach dem Albumin, während die andere, im γ -Bereich wandernde Präzipitation, dem IgA (Abb.16) zugehörig war.

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese

10 Tracheobronchialsekrete von Gesunden und 10 Sekrete von Patienten mit schweren Entzündungen der Tracheobronchialschleimhaut wurden mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese untersucht. Der Proteingehalt eines jeden Sekretes betrug 600mg/100ml.

Der Versuch wurde, wie auf Seite 27 beschrieben, durchgeführt. Von der Probe wurde je 5 μ l eingefüllt; die Antiserumkonzentration im Agar der 2. Dimension betrug 1,66%. Als Antiserum wurde Anti-Human-Serum vom Kaninchen (BEHRINGWERKE) verwendet, d.h. mit dieser Versuchsanordnung konnten auch wieder nur Serumproteine sichtbar gemacht werden.

Mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese sind aber im Gegensatz zur normalen Immunelektrophorese quantitative Aussagen möglich.

Vergleicht man die Bilder, die man mit Sekreten von Gesunden bekommt, mit denen, die man von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen erhält, so ist der Unterschied offensichtlich (Abb.17, Abb.18). Während in einem Normalsekret bis zu 8 Präzipitationslinien nachweisbar sind, sind es in den Proben von erkrankten Patienten bis zu 16. Trotz identischer Gesamtproteinkonzentration sind auf der Platte mit der entzündlichen Probe die Präzipitationspeaks viel höher als auf der mit dem normalen, nicht entzündlichen Sekret; dies ist ein sichtbarer Beweis für die in Kapitel 6 getroffene Feststellung, daß bei schweren entzündlichen Veränderungen der Anteil der Serumproteine am Gesamteiweiß des Tracheobronchialsekretes stark erhöht ist.

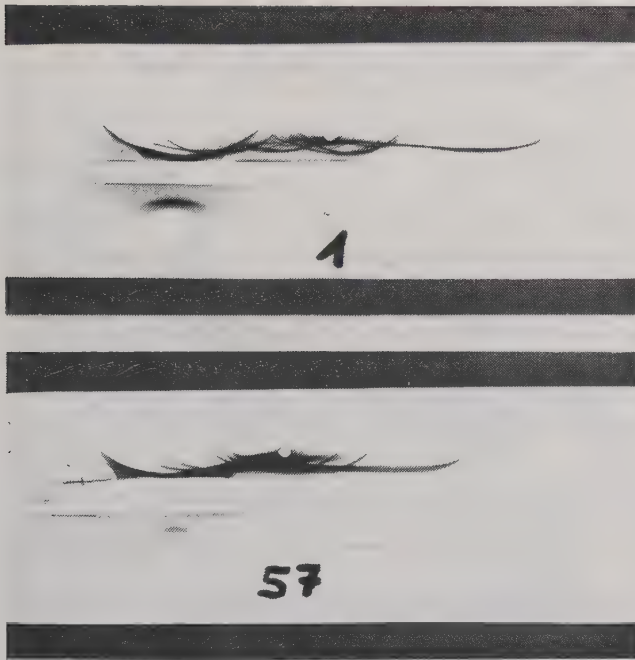


Abb. 16 Immunelektrophoretische Analysen von 2 Tracheobronchialsekreten (Proteinkonzentration 600mg/100ml) mit einem polyvalenten Anti-Human-Serum von Kaninchen (BEHRINGWERKE)
Obere Auftragstelle: normales Serum
Untere Auftragstelle: Tracheobronchialsekret



Abb. 17 Zweidimensionale Immunelektrophorese des Tracheobronchialsekrets (Proteinkonzentration 600mg/100ml) eines Patienten ohne entzündliche oder degenerative Veränderungen des Respirationstraktes.
Antiserum: Anti-Human-Serum vom Kaninchen

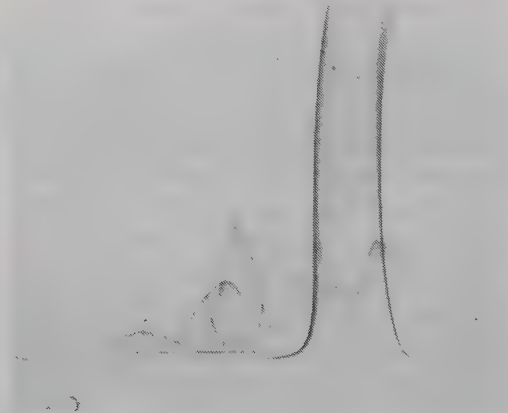


Abb. 18 Zweidimensionale Immunelektrophorese des Tracheobronchialsekrets (Proteinkonzentration 600mg/100ml) eines Patienten mit schweren entzündlichen und degenerativen Veränderungen des Respirationstraktes
Antiserum: Anti-Human-Serum vom Kaninchen

Aussagen über sekretspezifische Proteine können mit den unter a) und b) beschriebenen Methoden nicht gemacht werden.

c) Disk-Elektrophorese

Diese Methode hat den Vorteil, daß mit ihr nicht nur die Serumeiweiße, sondern auch die sekretspezifischen Proteine dargestellt werden können.

Untersucht wurden insgesamt 45 der 75 Tracheobronchialsekrete (die Gesamtproteinkonzentration der restlichen schon konzentrierten Sekrete lag unter 600mg/100ml); 19 dieser Sekrete stammten von Gesunden, 26 von Patienten mit pathologischen Veränderungen der Schleimhaut.

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte wie auf Seite 32 beschrieben.

1. Proteine im Tracheobronchialsekret von gesunden Patienten.

Abb. 19 zeigt die Auftrennung von 4 derartigen Sekreten; die Gelröhrchen wurden mit Coomassie-Blue angefärbt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 2 Stunden. An den Gelröhrchen können nach der Färbung bis zu 10 verschiedene Banden abgegrenzt werden. Auffällig ist die außerordentlich genaue Übereinstimmung der Banden der 4 Sekrete.

Von diesen 10 Banden sind jedoch nur die Banden 2, 3, 4, 7, 8, 9 regelmäßig bei jedem untersuchten Normalwert zu unterscheiden. Eine quantitative Auswertung mit einem Densitometer erfolgte nicht.

Als nächstes wurde der Versuch unternommen, einige der Banden zu identifizieren. Dazu wurde mit den Gel-Röhrchen nach der Elektrophorese eine Immunpräzipitation durchgeführt, wie sie auf Seite 34 beschrieben ist.

3 Proteine konnten den entsprechenden Banden (B) zugeordnet werden:

B 2 :	α_1 -Antitrypsin
B 4 :	Albumin
B 6 :	Transferrin

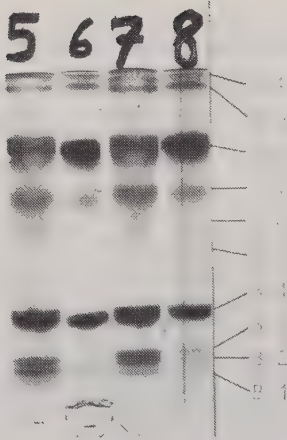


Abb. 19
Disk-elektrophoretische
Analyse im PAA-Gel von 4
Tracheobronchialsekreten
(Proteinkonzentration je
600/100ml) gesunder Pa-
tienten
Färbung: Coomassie-Blue
Dauer der Elektrophorese
2 Std.



Abb. 20
Disk-elektrophoretische Analy-
se im PAA-Gel von einem Tra-
cheobronchialsekret (Protein-
konzentration (600mg/100ml) ei-
nes gesunden Patienten
Färbung: Perjodsäure-Schiff
Dauer der Elektrophorese: 2 Std.

Mit dem Anti-IgA-Antiserum ergab sich eine Präzipitation am Kathodenende der Säule.

Zur weiteren Differenzierung wurde eine Anfärbung der Kohlenhydrat-Protein-Komplexe (siehe S.33) durchgeführt. Bei dieser Technik zeigten sich 2 stark angefärbte Banden (B3, B8) (Abb.20)

Gleichzeitig mit den Tracheobronchialsekreten wurden auch Serumverdünnungen (Proteinkonzentration 600mg%) aufgetrennt. Beim Vergleich der Sekret- und Serum-Gelröhrchen wurden die Banden 3, 7, 8, 9 als sekretspezifisch erkannt.

Um die langsam wandernden Immunglobuline sichtbar zu machen, wurde bei einem Lauf die Dauer der Elektrophorese von 2 auf 5 Stunden verlängert. Dadurch kommt es zu einem Einwandern der Immunglobuline an der Kathode, während an der Anode die schnell wandernden Proteine das Gel wieder verlassen.

Nach der anschließenden Immunpräzipitation konnte das IgA und das IgG ihren Banden zugeordnet werden (Bande 11 und 12) (Abb.21) Durch diese Untersuchungen gelang es also, folgende Banden zu identifizieren oder näher zu bezeichnen.

B 2 : α_1 -Antitrypsin

B 3 : sekretspezifisches Protein 1, hoher Gehalt an Kohlenhydrat-Protein-Komplexen

B 4 : Albumin

B 6 : Transferrin

B 7 : sekretspezifisches Protein 2

B 8 : sekretspezifisches Protein 3, hoher Gehalt an Kohlenhydrat-Protein-Komplexen

B 9 : sekretspezifisches Protein 4

Nur nach einer Elektrophorese von 5 Stunden nachweisbar:

B 11: IgA

B 12: IgG

Bei allen 19 Sekreten von Patienten ohne entzündliche oder degenerative Veränderungen des Tracheobronchialsystems konnten die Banden 2, 3, 4, 7, 8, 9 nachgewiesen werden. Insbesondere auf diese 6 Banden wurde bei der Beurteilung der Sekrete von erkrankten Patienten die Aufmerksamkeit gelenkt.

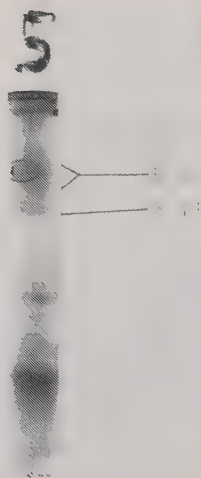


Abb.21
Disk-elektrophoretische Analyse
im PAA-Gel von einem Tracheo-
bronchialsekret (Proteinkonzent-
ration 600mg/100ml) eines ge-
sunden Patienten
Färbung: Coomassie-Blue
Dauer der Elektrophorese: 5 Std.

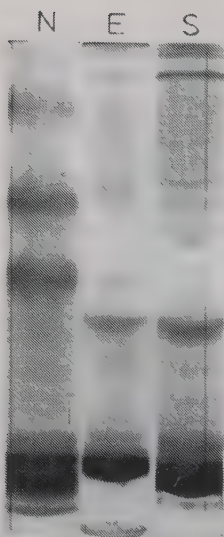


Abb.22
Disk-elektrophoretische Analyse
im PAA-Gel von
N: einem Tracheobronchialsekret
eines gesunden Patienten
E: einem Tracheobronchialsekret
eines Patienten mit schweren
entzündlichen und degenerati-
ven Veränderungen des Respi-
rationstraktes
S: einer Serumverdünnung
Alle 3 Proben haben eine Protein-
konzentration von 600mg/100ml
Färbung: Coomassie-Blue
Dauer der Elektrophorese: 2 Std.

2. Proteine im Tracheobronchialsekret von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstraktes.

21 der 26 untersuchten Sekrete zeigten die sekretspezifischen Banden 3, 7, 8, 9; daneben waren je nach dem Ausmaß der Serumtranssudation die Serumprotein-Banden immer zahlreicher und deutlicher sichtbar. Bei 5 Sekreten, deren Albumingehalt jeweils über 30mg/100mg Gesamtprotein lag, konnten von den sekretspezifischen Eiweißen nur noch die Banden 7 und 8 schwach nachgewiesen werden. Im übrigen waren nur noch Banden von Serumproteinen nachweisbar. (Abb. 22 E) Da sich die einzelnen Proteinbanden von Lauf zu Lauf doch geringfügig verschieben, ist es sehr empfehlenswert bei jeder Auftrennung von unbekannten Proben ein Normalsekret und eine Serumverdünnung mit aufzutrennen.

B. Diskussion

Die Proteine des Tracheobronchialsekretes haben zwei verschiedene Ursprünge:

- a) Eiweiße, die durch Transsudation aus dem Serum stammen
- b) Eiweiße, die sekretspezifisch sind und im Serum nicht zu finden sind.

Der Prozentsatz der unter a) genannten Proteine am Gesamtprotein der Sekrete ändert sich, wie schon in Abschnitt 6 festgestellt, mit dem Ausmaß der pathologischen Veränderungen an der Schleimhaut des Tracheobronchialsystems.

Über Veränderungen der sekretspezifischen Eiweiße bei bestimmten Krankheiten ist, mit Ausnahme des 11s-IgA, noch sehr wenig bekannt.

Entsprechend dieser Unterteilung können auch die beschriebenen Methoden getrennt werden in Untersuchungen, die nur Serumproteine aufzeigen und solche, die sowohl Serum- als auch sekretspezifische Eiweiße erfassen.

Mit der einfachen und der zweidimensionalen Immunelektrophorese konnten in der vorliegenden Arbeit nur Serumproteine erfaßt werden.

Der Grund hierfür liegt darin, daß nur Anti-Human-Serum zur Verfügung stand; mit einem Antiserum gegen die Eiweiße des Tracheobronchialsekrets hätten natürlich auch sekretspezifische Proteine dargestellt werden können.

Beide Methoden sind äußerst materialsparend; die einzusetzende Menge liegt bei etwa 5 μ l.

Die einfache Immunelektrophorese ist für den niedrigen Proteingehalt der untersuchten Proben zu unempfindlich; aus den 2 Präzipitationslinien, die man erhält, können weder qualitative noch semiquantitative Aussagen gemacht werden.

Wesentlich empfindlicher dagegen ist die zweidimensionale Immunelektrophorese; 8 - 16 Peaks konnten nachgewiesen werden. Außerdem ist es hier möglich, quantitative Aussagen zu machen. So kann durch den Vergleich der Auftrennung eines Normalsekrets mit der einer zu untersuchenden Probe aus der Höhe der Präzipitationskurven auf den Gehalt des Sekretes an Serumproteinen, und damit auf das Ausmaß der Serumtranssudation bzw. Exsudation, geschlossen werden. Weitere Aussagen können bei Verwendung eines Anti-Human-Serums nicht gemacht werden; interessant wäre es, diese Methode mit einem Antiserum gegen Tracheobronchialsekret durchzuführen.

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disk-Elektrophorese) stellt sowohl Serum- als auch sekretspezifische Proteine dar. Diese Methode ist sehr empfindlich und materialsparend; mit ihr ist sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse möglich.

In dieser Arbeit wurde nur die qualitative Aussage berücksichtigt.

Aus dem "Bandenmuster" der Gelröhrchen der Disk-Elektrophorese können zwei Dinge abgelesen werden.

a) Inwieweit kommt es bei pathologischen Zuständen zu Veränderungen der verschiedenen nachzuweisenden sekretspezifischen Proteine bezüglich der Konzentration oder der Beweglichkeit im elektrischen Feld? Diese Frage kann qualitativ oder quantitativ mit einem Densitometer gelöst werden.

Bei 40 der untersuchten Proben konnte qualitativ keine Veränderung der sekret-spezifischen Eiweiße beobachtet werden. In 5 Proben war nur die Hälfte der sonst regelmäßig vorkommenden sekret-spezifischen Proteine darzustellen. Bei diesen Sekreten war jedoch die Exsudation von Serumproteinen ins Sekret so stark, daß der relative Anteil der sekretspezifischen Eiweiße stark erniedrigt war und so einige dieser Proteine nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

b) Wie mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese kann auch mit der Disk-Elektrophorese das Ausmaß der Serumexsudation ins Sekret und damit in etwa der Grad der Schleimhautschädigung beurteilt werden.

Die Auswertung wurde in dieser Arbeit subjektiv derartig vorgenommen, daß das Gelröhrchen mit der zu untersuchenden Probe neben das einer Serumverdünnung und eines Normalsekretes gestellt wurde. Dann wurde durch Vergleich beurteilt, ob die Verteilung der Proteinbanden der Probe mehr dem Serum oder dem Normalsekret entsprach. (Abb.22)

Als die Ergebnisse dieser Begutachtung mit den, unabhängig davon ermittelten, Albuminkonzentrationen im Sekret verglichen wurden, ergab sich, daß alle als "entzündlich" (serum-ähnliche Proteinbanden) eingestuften Proben einen Albumingehalt über 20mg/100 mg Gesamtprotein aufwiesen.

Ein Nachteil der Disk-Elektrophorese ist allerdings, daß die Immunglobuline, die ja eine große Rolle in den Sekreten spielen, bei einer üblichen Auftrennung (Laufdauer 2 Std.) nicht beurteilt werden können, da sie an der Kathode nicht ins Gel einwandern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß von den drei untersuchten Methoden die Disk-Elektrophorese am besten zur Übersichtsdarstellung der Proteine in Tracheobronchialsekret geeignet ist.

Sie ist materialsparend, empfindlich, erfasst serum- und sekret-spezifische Eiweiße und ist sowohl qualitativ als auch quantitativ auswertbar. Wird eine Beurteilung der Immunglobuline gewünscht, so ist es günstiger, diese einzeln mit immunchemischen Meßmethoden zu bestimmen.

V. Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf dem Immunglobulin A. Durch Erprobung von Methoden zur IgA-Bestimmung und deren Anwendung in Seren und Tracheobronchialsekreten von Kindern wird versucht, einer Klärung der Bedeutung des IgA für die Immunabwehr im Kindesalter näher zu kommen.

Bei der IgA-Bestimmung in Seren und Sekreten ist es wichtig, zwischen Methoden, die sowohl das Serum-7s-IgA als auch das Sekret-11s-IgA erfassen und solchen, die selektiv 11s-IgA bestimmen, zu unterscheiden.

Mit dem IgA-Latex-Test, einem auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhenden Agglutinationstest, kann IgA (sowohl Serum-7s-IgA als auch Sekret-11s-IgA) qualitativ oder semiquantitativ bestimmt werden. Der qualitative IgA-Nachweis kann dazu benützt werden, um noch IgA-Konzentrationen unter 0,4mg/100ml in Seren oder Sekreten nachzuweisen; dadurch wird es möglich, IgA-Mangelzustände zu beweisen bzw. auszuschließen. Die semiquantitative IgA-Bestimmung (positive Agglutination bei IgA-Konzentrationen größer 3mg/100ml) bietet eine Möglichkeit, erhöhte IgA-Konzentrationen im Nabelvenenblut und damit den Verdacht auf eine intrauterin oder perinatal erworbene Infektion, schnell und einfach zu erfassen.

Neben dem IgA-Latex-Test wird eine selektive 11s-IgA-Bestimmung erprobt; diese wird durch eine Kombination von drei verschiedenen immunchemischen Methoden erreicht.

Mit Hilfe der selektiven 11s-IgA-Bestimmung wird die Entwicklung des lokalen Immunsystems der Schleimhäute des Tracheobronchialsystems von der Geburt bis zum 14. Lebensjahr untersucht. Es zeigt sich, daß bereits mit dem 2. Lebensjahr das lokale Immunsystem voll ausgereift ist und dem von Erwachsenen entspricht. Nur in den ersten beiden Lebensjahren zeigen sich Befunde, die auf eine gewisse Unreife hindeuten und die bei älteren gesunden Kindern nicht mehr nachgewiesen werden können.

Anders sind die Verhältnisse bei erkrankten Patienten. Hier kann gezeigt werden, daß es bei akuten Entzündungen, unabhängig vom Lebensalter, zu einer überschießenden IgA-Produktion kommt. Bei chronischen degenerativen Erkrankungen des Tracheobronchialsystems hingegen ist, abhängig vom Schweregrad und damit von der Schädigung der Schleimhaut, das Sekret-11s-IgA häufig vermindert; daneben zeigen sich Befunde, die sonst nur bei Patienten mit einem unreifen lokalen Immunsystem (Kinder im 1. und 2. Lebensjahr) gefunden werden.

Besonderes Augenmerk wird auf 3 Patienten gerichtet, bei denen kein 11s-IgA nachweisbar ist.

Eine mögliche Therapie dieses 11s-IgA-Mangels im Sekret bei chronischen Erkrankungen des Tracheobronchialsystems ist die Substitution von IgA. Es kann an einem 14-jährigen Jungen mit einer Agammaglobulinämie gezeigt werden, daß IgA nach einer i.v. Injektion im Sekret erscheint. Dabei spielt neben einer passiven Diffusion wahrscheinlich auch ein aktiver Transport eine Rolle. Bei diesem Patienten mit einem exzessiven IgA-Mangel kann noch gezeigt werden, daß auch das IgM aktiv vom Serum ins Sekret transportiert oder lokal in der Schleimhaut produziert werden kann.

Neben dem IgA werden noch weitere serum- und sekretspezifische Proteine, sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Zuständen, im Serum und Tracheobronchialsekret untersucht. Es zeigt sich, daß die Serumproteine Albumin, α_1 -Antitrypsin, Coeruloplasmin, α_2 -Macroglobulin, β_1 A-Globulin, IgG und IgM nur passiv vom Serum ins Sekret diffundieren.

Neben der Bestimmung einzelner Proteine wird versucht, eine Übersichtsdarstellung mehrerer Sekretproteine gleichzeitig zu erreichen. Von den drei getesteten Methoden (einfache Immunelektrophorese, zweidimensionale Immunelektrophorese, Disk-Elektrophorese) ist die Disk-Elektrophorese am besten geeignet, die Aufgabe zu erfüllen; sie ist materialsparend, empfindlich, erfasst serum- und sekretspezifische Eiweiße und ist sowohl qualitativ als auch quantitativ auswertbar.

VI. Literaturverzeichnis

1. Allansmith M., Mc Clellan B. H., Butterwarth M.
The development of immunoglobulin levels in man
J. of Pediat. 72 (1968) 276
2. Bandilla K.K., Mc Duffie F. C., Gleich G. J.
Immunoglobulin classes of antibodies' produced in the
primary and secondary responses in man
Clin. Exp. Immunol. 5 (1969) 627
3. Bardare M., Cislachi G. U., Zuccoli G.
Kinder mit rekurrierenden Infektionen des Respira-
tionstraktes
Helv. paediat. Acta 26 (1971) 173
4. Becker W., Rapp W. Schwick H. G.
Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen
durch Immunpräzipitation
Z. Klin. Chem. 6 (1968) 113
5. Bienenstock J., Tomasi T. B.
Secretory γ - A in normal urine
J. Clin. Invest. 47 (1968) 1162
6. Bienenstock J., Perey D. Y. E.
Immune mechanism of mucosal resistance
Med. Clin. N. Amer. 56 (1972) 391
7. Brandtzaeg P.
Hidden antigenic determinant in secretory immunoglo-
bulin A
Nature (London) 220 (1968) 292
8. Brandtzaeg P., Fjellanger J., Gjeruldsen S. T.
Immunoglobulin M: Local synthesis and selective secre-
tion in patients with immunoglobulin A deficiency
Science 160 (1968) 789
9. Brandtzaeg P.
Human secretory immunoglobulin I
Salivary secretions from individuals with normal or
low levels of serum immunoglobulins
Scand. J. Haematol. Suppl. 12 (1970) 1

10. Brandtzaeg P.
Human secretory immunoglobulin II
Salivary secretions from individuals with selectively excessive or defective synthesis of serum immunoglobulins
Clin. Exp. Immunol. 8 (1971) 69
11. Brandtzaeg P.
Human secretory immunoglobulin III
Immunochemical and physicochemical studies of secretory IgA and free secretory piece
Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 79 (1971) 165
12. Brandtzaeg P.
Human secretory immunoglobulins IV
Quantitation of free secretory piece
Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 79 (1971) 189
13. Brasher G. W., Hartly T. F.
Quantitation of IgA and IgM in umbilical cord serum of normal newborn infants
J. Pediat. May (1969) 784
14. Brasher G. W., Deitermann J.
Salivary IgA and infection in children with atopy
Ann. Allergy 30 (1972) 241
15. Bürgi H., Medici T.
Das IgA und IgG-System bei spastischer Bronchitis im Kindesalter
Dtsch. med. Wschr. 95 (1970) 91
16. Bull. D. M., Bienenstock J., Tomasi T. B.
Studies on human intestinal immunoglobulin A
Gastroenterology 60 (1971) 370
17. Burtin P., Hartmann L., Heremans J. F.
Études immuno-chimiques et immuno-électrophorétiques des Macroglobulinémies
Rev. Franc. Et. Clin. Biol. 2(1957) 161
18. Butler W. T., Waldmann T. A., Rossen R.D.
Changes in IgA and IgG concentrations in nasal secretions prior to the appearance of antibody during viral respiratory infection in man
J. Immunol. 105 (1970) 584

19. Butler W. T., Rossen R. D., Waldmann T. A.
The mechanism of appearance of immunoglobulin A in
nasal secretions in man
J. Clin. Invest. 46 (1967) 1883
20. Caldwell R. C., Pigman W.
Disc electrophoresis of human saliva in polyacrylamide
gel
Arch. Biochem. Biophys. 110 (1965) 91
21. Clarke M. H. G., Freeman T.
Quantitative immunoelectrophoresis of human proteins
Clin. Sci. 35 (1968) 403
22. Cole E. G., Mecham D. K.
Cyanate formation and electrophoretic behaviour of
proteins in gels containing urea
Ann. Biochem. 14 (1966) 215
23. Editorial: Immunglobulin synthesis by the human
fetus
New England J. Med. 277 (1967) 485
24. Eibl M.
Untersuchungen und Diagnose immunologischer Mangel-
erkrankungen
Wien Klin. Wschr. 84 (1972) 650
25. Führ J., Hinz O. S.
Eine einfache kolorimetrische Methode zur Liquor-
eiweißbestimmung
Klin. Wschr. 31 (1953) 153
26. Führ J., Hinz O. S.
Experimenteller Beitrag zur Bestimmung kleinster
Eiweißmengen in biologischem Material
Klin. Wschr. 33 (1955) 87
27. Furth v. R., Schuit H. R., Hijmans W.
The immunological development of the human fetus
J. Exp. Med. 122 (1965) 1173
28. Furthmayr H., Timpl R.
Characterization of collagen peptides by sodium
dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis
Analytical Biochemistry 41 (1971) 510

29. Gabl F., Egger E.
Charakterisierung von Speichelproteinen
Clin. Chim. Acta 4 (1959) 62
30. Gabl F., Pastner D.
Die immunologische Bedeutung von Immunglobulin A
in Serum und Sekreten
Wien. Klin. Wschr. 85 (1973) 397
31. Genco R. J., Taubmann M. A.
Secretory γ A-antibodies induced by local immunization
Nature 221 (1969) Nr. 5181 p. 679
32. Grabar P., Williams C. A.
Methode permettant l'Etude conjuguée des Propriétés
Electrophoretiques et immunochimiques D'un Mélange
de Protéines. Application au serum sanguin
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 10 (1953) 193
33. Grabar P., Burtin P., Hermann G.
Immuno-Elektrophoretische Analyse
Amsterdam, London, New York (1964)
Elsevier Publishing Company
34. Gugler E., Bokelmann G., Dätwyler A.
Über immunoelktrophoretische Untersuchungen an Frauen-
milchproteinen
Schweiz. Med. Wschr. 88 (1958) 1264
35. Gugler E., Pallavicini J. C., Swerdlow H.
Immunological studies of submaxillary saliva from
patients with cystic fibrosis and from normal
children
J. of Pediat. 73 (1968) 548
36. Halpern M. S., Koshland M. E.
Novel subunit in secretory IgA
Nature 228 (1970) 1276
37. Hanson L. A.
Aspects of the absence of the IgA-system
Birth defects original article series Vol IV Nr. 1
(1968) 292
The National Foundation - March of Dimes
38. Hanson L. A., Holmgren J., Wadsworth Ch.
A radial immuno-gel filtration method for charakteri-
zation and quantitation of macromolecules
Int. Arch. Allergy 40 (1971) 806

39. Haworth J. C., Dilling L.
Concentration of γ A-globulin in serum, saliva and nasopharyngeal secretions of infants and children
J. Lab. Clin. Med. 67 (1966) 922
40. Hobbs J. R.
Immunoglobulins in clinical chemistry
Adv. Clin. Chem. 14 (1971) 219
41. Hobday J. D., Cake M., Turner K. J.
A comparison of the immunoglobulins IgA, IgG and IgE in nasal secretions from normal and asthmatic children
Clin. Exp. Immunol. 9 (1971) 577
42. Humphrey J. H., White R. G.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
43. Ishizaka T., Ishizaka K., Borsos T.
Complement fixation by human isoagglutinins:
Fixation of C_1 by gamma G and gamma M but not by gamma A antibody
J. Immunol. 97 (1966) 716
44. Kasel J. A.
Antibody responses in nasal secretions and serum of elderly persons following local or parenteral administration of inactivated influenza virus vaccine
J. Immunol. 102 (1969) 555
45. Kehoe J. M., Tomasi T. B., Ellouz F.
Identification of "J"-Chain in a homogeneous canine IgA immunoglobulin
J. Immunol. 109 (1972) 59
46. Keimowitz R. J.
Immunoglobulins in normal human tracheobronchial washings
J. Lab. Clin. Med. 63 (1964) 54
47. Kleihauer E., Hötzel U., Betke K.
Die materno-fetale Transfusion
Mtschr. Kinderheilk. 115 (1967) 145
48. Laurell C. B.
Antigen-antibody crossed electrophoresis
Anal. Biochem. 10 (1965) 358

49. Lewis D. M., Lapp N., Burrell R.
Quantitation of secretory immunoglobulin A in
chronic pulmonary disease
Amer. Rev. Resp. Dis. 101 (1970) 55
50. Little T. M.
Immunoglobulin levels in families with coeliac
disease
Lancet 2 (1972) 400
51. Mc Cracken G. H., Shinefield H. R.
Immunoglobulin concentrations in newborn infants with
congenital cytomegalic inclusion disease
Pediatrics 36 (1965) 933
52. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F.
Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion
Immunochem. 2 (1965) 235
53. Masson P. L., Heremans J. F., Prignot J.
Proteins of bronchial secretions
Acta Biochim. Biophys. 111 (1965) 466
54. Masson P. L., Heremans J. F., Prignot J.
Immunohistochemical localisation of the iron-binding
protein lactoferrin in human bronchial glands
Experientia 21 (1965) 604
55. Masson P. L., Heremans J. F., Prignot J.
Immunohistochemical localisation and bacteriostatic
properties of an iron binding protein from bronchial
mucus
Thorax 21 (1966) 538
56. Maurer H. R.
Disk-Elektrophorese
Walter de Gruyter u. Co. (1968)
57. Mawhinney H., Tomkin G. H.
Gluten enteropathy associated with selective
IgA deficiency
Lancet 2 (1971) 121
58. Medici T. C., Bürgi H.
The role of immunoglobulin A in endogenous bronchial
defense mechanism in chronic bronchitis
Am. Rev. Resp. Dis 103 (1971) 784

59. Mestecky J., Zikan J., Butler W. T.
Studies on human secretory immunoglobulin A-III
J Chain
Immunochemistry 9 (1972) 883
60. Meyer P., Vogt K., Zippel R.
Zur Bestimmung von Gesamteiweiß im Speichel
Z. Laryng. Rhinol. 46 (1967) 905
61. Meyer T. S., Lamberts B. L.
Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips
Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 144
62. Michel F. B.
Verhalten des IgA in Serum und Sekret im Verlauf von Bronchialinfekten
Vortrag gehalten im Rahmen der "Immunologischen Tage"
Münster 8.-10.11.73
63. Miller M. J., Seaman E., Remington J. S.
The clinical spektrum of congenital toxoplasmosis problems in recognition
J. Pediat. 70 (1967) 714
64. Miller M. J., Sunshine P. J., Remington J. S.
Quantitation of cord serum IgM and IgA as a screening procedure to detect congenital infection:
Results in 5006 infants
J. Pediat. 75 (1969) 1287
65. Monton R. P., Stoop J. W., Ballieux R. E.
Pneumococcal antibodies in IgA of serum and external secretions
Clin. Exp. Immunol. 7 (1970) 201
66. Munster P. J. J. van, et. al.
Evidence of immunochemical differences between free and bound secretory piece
Immunology 17 (1969) 165
67. Natvig J. B., Harboe M., Fansa O.
Family studies in individuals with selective absence of γ A-globulin
Clin. Exp. Immunol. 8 (1971) 229

68. Newcomb G.
Protein concentrations in sputa from asthmatic children
Albumin, lactoferrin, IgA and IgG
J. Lab. Clin. Med. 73 (1969) 734
69. O'Daly J. A., Cebra J. J.
Rabbit secretory IgA
I. Isolation of secretory component after selective dissociation of the immunoglobulin
J. Immunol. 107 (1971) 436
70. Ogra P. L., Karzon D. T.
Poliovirus antibody response in serum and nasal secretion following intranasal inoculation with inactivated poliovaccine
J. Immunol. 102 (1969) 15
71. Ornstein L., Davis B. J.
Disc-Electrophoresis
Distillation Products Industries
Division of Eastman Kodak Comp.; 1959
72. Ouchterlony O.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Progr. Allergy 5 (1958) 1
73. Ouchterlony O.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II
Progr. Allergy 6 (1962) 30
74. Schlimok G., Neuhaus F., Welsch H., Tympner K. D.
Der IgA-Latex-Test
Klin. Pädiat. 186 (1974) 529
75. Schultze H. e., Heremans J. F.
Molecular biology of human proteins Bd. 1
Elsevier Amsterdam-London-New-York (1966)
76. Selner J. C.
Salivary immunoglobulins: Absence of gamma A in saliva following exchange transfusions in neonatal period
Pediatrics 40 (1967) 452
77. Selner J. C., Merrill D. A., Clamary H. N.
Salivary immunoglobulin and albumin: Development during the newborn period
J. of Pediat. 72 (1968) 685

78. Sever J. L.
Immunoglobulin determination for the defection of
perinatal infection
J. Pediat. 75 (1969) 1111
79. Sever J. L.
Latex-reagent for determinig IgM levels in cord
and newborn sera
J. Immunol. 102 (1969) 679
80. Sieber O. F., Fulginiti V. A., Barie J.
In utero infection of fetus by herpes simplex virus
J. Pediat. 69 (1966) 30
81. Simmons P.
Quantitation of plasma proteins in low concen-
trations using RJD
Clin. Chim. Acta 35 (1971) 53
82. Smith C. B., Bellanti J. A., Chanrock R. M.
Immunoglobulins in serum and nasal secretions
following infection with type 1 parainfluenza virus
and injection of inactivated vaccines
J. Immunol. 99 (1967) 133
83. South M. A., Cooper M. D., Wollheim F. A.
The IgA System
I. Studies of the transport and immunochemistry of
IgA in the saliva
J. Exper. Med. 123 (1966) 615
84. South M. A., Warwick W. J., Wollheim F. A.
The IgA System
III. IgA levels in the serum and saliva of pediatric
patients-evidence for a local immunological
system
J. of Pediat. 71 (1967) 645
85. South M. A., Cooper M. D., Wollheim F. A.
The IgA System
II. The clinical significance of IgA-deficiency:
Studies in patients with agammaglobulinemia
and ataxia-telangiectasia
Am. J. Med. 44 (1968) 168
86. Stark G. R., Stein W.H., Moore S.
Reactions of cyanate present in aqueous urea with
acids and proteins
J. Biol. Chem. 235 (1960) 3177

87. Stiehm E. R., Fudenberg H. H.
Serum levels of immune globulins in health and
disease: A Survey
Pediatrics 37(1966) 715
88. Strauch L.
Ultramikro-Methode zur Bestimmung des Stickstoffes
in biologischem Material
Z. Klin. Chem. 3 (1965) 165
89. Svedberg T., Pedersen K. O.
Die Ultrazentrifuge
Dresden: Steinkopff (1940)
90. Thompsen R. A.
Secretory piece linked to IgM in individuals
deficient in IgA
Nature 226 (1970) 946
91. Tomasi T. B., Zigelbaum S.
The selective occurrence of δ_4 A globulins in certain
body fluids
J. Clin. Invest. 42 (1963) 1552
92. Tomasi T. B., Tan E. M., Solomon A.
Characteristics of an immune system common to
certain external secretions
J. Exp. Med. 121 (1965) 101
93. Tomasi T. B., Bienenstock J.
Secretory Immunoglobulins
Adv. Immunol. 9 (1968) 1
94. Tomasi T. B.
Resistance of IgA to proteolysis
Fed. Proc. 27 (1968) 617
95. Tomasi T. B.
Secretory Immunoglobulins
New Engl. J. Med. 287 (1972) 500
96. Tourville D. R., Adler R. H., Bienenstock J.
The human secretory immunoglobulin system:
Immunohistological localization of δ_4 A,
secretory "piece" and lactoferrin in normal human
tissues
J. Exp. Med. 129 (1969) 411

97. Tympner K. D.
Die Bedeutung der Immunglobuline (IgM und IgA)
für die Diagnose und Therapie in der Kinderheil-
kunde
Habilitationsschrift, München (1971)
98. Tympner K. D.
Die Bedeutung quantitativer Immunglobulin-Bestim-
mungen (IgM, IgA) für die Diagnostik und Therapie
von Infektionen in der Neugeborenen-Periode
Mschr. Kinderheilk. 119 (1971) 287
99. Tympner K. D., Neuhaus F.
IgM-Latex-Test
Dtsch.med. Wschr. 97 (1972) 2003
100. Waldenström J.
Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulin-
emia with fibrinogenopenia-a new syndrome?
Acta Med. Scand. 117 (1944) 216
101. Waldman R. H.
Influenza virus neutralizing antibody in human
respiratory secretions
J. Immunol. 100 (1968) 80
102. Walton K. W.
Immunological deficiency and impaired resistance
to infection
Brit. Med J. 1 (1972) 498
103. Weeke B.
Quantitative estimation of human immunoglobulins
following carbamylation by electrophoresis in
antibody-containing agarose
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22 (1968) 107
104. Weeke B.
Carbamylated human immunoglobulins tested by
electrophoresis in agarose and antibody-containing
agarose
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (1968) 351
105. Wiersbitzky S., Türk E.
Laktoferrin und Luftwegsinfekte im Säuglingsalter
Acta Biol. Med. German 22 (1969) 97

106. Wiersbitzky S.
Neue Erkenntnisse zur Entstehung und Behandlung
des chronischen und bronchitischen Syndroms im
Kindesalter
Dtsch. Med. Wschr. 97 (1972) 184
107. Williams R. C., Gibbons R. J.
Inhibition of bacterial adherence by secretory
immunoglobulin A; A Mechanism of Antigen Disposal
Science 177 (1972) 697

Herrn Priv.Doiz.Dr.med. K.D. Tympner möchte ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Beratung und Unterstützung, der ich jederzeit gewiß sein konnte, meinen Dank aussprechen.

Bei Frau Dr.med. I. Butenandt und Herrn Dr.med. K. Mantel bedanke ich mich für die Überlassung der Tracheobronchialsekrete und Bronchoskopieberichte. Für seine Hilfe bei der Isolierung des sekretorischen IgA danke ich auch Herrn Dr.med. R. Hirsch (Institut für Physiologische Chemie)

Lebenslauf

Am 28. Januar 1949 wurde ich als Sohn des Bundesbahn-Betriebsinspektors Erich Schlimok und seiner Frau Elisabeth, geb. Wagner, in Aichach/Obb. geboren. Seit 1951 wohnen wir in Augsburg; dort besuchte ich von 1955 bis 1959 die Volksschule.

Im Herbst 1959 trat ich in das Holbein-Gymnasium in Augsburg ein, wo ich im Juli 1969 das Abitur absolvierte.

Mein Medizinstudium begann ich, nach Ableistung von 9 Monaten Grundwehrdienst bei der Bundeswehr, im Sommersemester 1970 an der Universität München. Dort bestand ich im April 1971 das Vorphysikum und im Oktober 1972 das Physikum.

Das Staatsexamen legte ich im Dezember 1975 ab.

